

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Radmila Kudláčková

Růst buněk na biomateriálech pro kožní náhrady a kryty
Cell growth on biomaterials for skin replacements and wound dressings

Diplomová práce

Školitel: Doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc.

Praha, 2016

Poděkování

Ráda bych poděkovala školitelce Doc. MUDr. Lucii Bačákové, CSc. za její čas a cenné rady, celému Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství Fyziologického ústavu AV ČR, zejména Ing. Markétě Bačákové za její pomoc a trpělivé odborné vedení, Ing. Margit Žaloudkové, Ph.D., Ing. Petru Mikešovi, Ph.D., Ing. Tomášovi Sopuchovi a Ing. Martinu Pelclovi za externí spolupráci a své rodině a příteli Jakubovi Žižkovi za podporu při vypracování této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08. 08. 2016

Bc. Radmila Kudláčková

Abstrakt

Tkáňové inženýrství je mladý mezipředmět rozvíjející možnost léčby defektů tkání pacienta pomocí umělých náhrad. Kožní tkáňové inženýrství pracuje na vývoji kožních náhrad a krytů, které by nahradily stávající léčbu pomocí autologních, alogenních či xenogenních náhrad, které s sebou nesou řadu rizik. Na materiály, které by měly sloužit jako nosiče kožních fibroblastů a keratinocytů, jsou kladeny značné nároky. Musí být v těle degradovatelné, ale takovou rychlostí, aby je tělo stihlo nahradit novou tkání. Aby mohlo dojít k tvorbě nové tkáně, musí buňky na materiálech dobře adherovat a proliferovat. Materiály nesmí být pro buňky toxické a s výhodou mohou uvolňovat růstové faktory a antimikrobiální substance. V rámci této diplomové práce byly hodnoceny vlastnosti materiálů ze sodné soli karboxymethylcelulózy (Hcel® NaT) a nanovláknenných membrán z poly-ε-kaprolaktonu (PCL), z kopolymeru L-laktidu a ε-kaprolaktonu (PLA/PCL) a z acetátu celulózy (AC) z hlediska adheze a růstu buněk. Pro hodnocení byly zvoleny primární lidské kožní fibroblasty a keratinocyty linie HaCaT. Adheze buněk byla sledována fluorescenční mikroskopií a proliferace metodou metabolického testu (WST-1). Potenciální cytotoxicita materiálů byla hodnocena v přístroji xCELLigence®. Přestože materiály nevykazovaly buněčnou cytotoxicitu, příliš nepodporovaly adhezi a růst buněk. Pro zlepšení kolonizace materiálů buňkami byl povrch materiálu modifikován bioaktivními molekulami. Byl použit kolagen typu I, který je hlavní složkou mezibuněčné hmoty dermis a dále fibrin, účastníci se hemokoagulace a procesu hojení rány. Obě proteinové modifikace zlepšily adhezi a růst buněk na materiálech. Z dosažených výsledků dále vyplývá, že pro adhezi buněk jsou vhodnější nanovláknenné membrány, a to zejména připravené z acetátu celulózy.

Klíčová slova

Tkáňové inženýrství, kůže, nanovláknna, celulóza, fibroblasty, keratinocyty, fibrin, kolagen.

Abstract

Tissue engineering is an emerging interdisciplinary field developing new ways of treatment of patient's tissue defects using artificial substitutes. Skin tissue engineering is developing skin substitutes and wound dressings that would replace current treatment using autologous, allogeneic or xenogenic substitutes. There are high demands on materials which should serve as a scaffolds for dermal fibroblasts and keratinocytes. They must be non-cytotoxic and biodegradable with a rate proportional to formation of a new tissue. The materials should support adhesion and proliferation of the cells and even they could release growth factors and antimicrobial substance to enhance healing and new tissue formation. In this master thesis, the cell adhesion and proliferation were evaluated on sodium carboxymethyl cellulose (Hcel® NaT), poly- ϵ -caprolactone (PCL), poly-L-lactide-co- ϵ -caprolactone (PLA/PCL) and cellulose acetate (AC) nanofiber membranes. Primary human dermal fibroblasts and HaCaT cell line keratinocytes were selected for evaluation. The cell adhesion was observed by fluorescent microscopy, the proliferation was determined by metabolic assay (WST-1) and the material cytotoxicity was evaluated in xCELLigence® system. Materials did not show cytotoxic effects on the cells. However, the materials did not sufficiently support cell adhesion and proliferation. The colonization of the scaffold was improved by protein coatings. Collagen I, the main component of dermal extracellular matrix, and fibrin involved in the coagulation and wound healing, were selected for material surface modification. Both protein modifications improved adhesion and growth of cells on materials. The obtained results further show that nanofiber membranes are more suitable for cell adhesion, especially if they are fabricated from cellulose acetate.

Key words

Tissue engineering, skin, nanofibers, cellulose, fibroblasts, keratinocytes, fibrin, collagen.

Obsah

Abstrakt.....	e
Klíčová slova	e
Abstract	f
Key words.....	f
Seznam zkratek	10
1 Úvod	12
2 Literární přehled	13
2.1 Tkáňové inženýrství.....	13
2.2 Adheze buněk na materiál	14
2.3 Fyzikální a chemické vlastnosti materiálů	16
2.3.1 Smáčivost	16
2.3.2 Drsnost a topografie.....	17
2.3.3 Elektrický náboj a vodivost	18
2.3.4 Tuhost a deformovatelnost.....	19
2.4 Anatomie a funkce kůže	19
2.4.1 Epidermis.....	20
2.4.2 Dermis.....	21
2.4.3 Hypodermis	22
2.5 Léčba kožních poranění	22
2.5.1 Kožní kryty	23
2.5.2 Kožní náhrady.....	25
2.6 Materiály pro kožní tkáňové inženýrství.....	27
2.6.1 Celulózové materiály.....	27
2.6.2 Poly- ϵ -kaprolakton.....	29
2.6.3 Kopolymer L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu	30
2.6.4 Nanostrukturované materiály.....	30
3 Cíle práce	34

4	Materiály	35
4.1	Použité materiály.....	35
4.2	Přístrojové vybavení.....	35
4.3	Chemikálie.....	36
4.4	Buněčné typy	38
4.5	Laboratorní nádobí.....	38
5	Metody.....	39
5.1	Výroba materiálů	39
5.1.1	Výroba materiálů Hcel® NaT	39
5.1.2	Výroba nanovláknenných membrán.....	39
5.2	Hodnocení struktury materiálů a měření velikosti vláken	40
5.3	Příprava vzorků.....	40
5.4	Proteinové modifikace	41
5.4.1	Kolagenové vrstvy	41
5.4.2	Fibrinové vrstvy.....	41
5.5	Kultivace buněk na materiálech	42
5.6	Sledování morfologie proteinových modifikací na materiálech	42
5.7	Hodnocení adheze, morfologie a proliferace buněk na materiálech	43
5.8	Měření metabolické aktivity buněk	44
5.9	Testování materiálů na cytotoxicitu.....	44
6	Výsledky	46
6.1	Struktura materiálů.....	46
6.2	Adheze, morfologie, proliferace a metabolická aktivita buněk na materiálech	48
6.2.1	Materiály Hcel® NaT	48
6.2.2	Nanovláknenné membrány.....	50
6.3	Hodnocení cytotoxicity materiálů	52
6.4	Úprava vlastností materiálů.....	54
6.4.1	Struktura a stabilita kolagenových vrstev na Hcel® NaT	54

6.4.2	Struktura a stabilita fibrinových vrstev na Hcel® NaT a na nanovláknenných membránách	55
6.4.3	Adheze, morfologie a proliferace buněk na modifikovaných celulózných materiálech Hcel® NaT	57
6.4.4	Modifikace nanovláknenných membrán	60
7	Diskuze.....	62
	Závěr.....	70
	Literatura.....	72
	Přílohy	i

Seznam zkratek

AC	Acetát celulózy
ANOVA	Analýza rozptylu (Analysis of variance)
A-T	Adenosin-thymin
CAMs	Buněčné adhezní molekuly
Ctrl	Kontrola
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DGEA	Aminokyselinová sekvence aspartát- glycin-glutamát-alanin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DS	Stupeň substituce karboxymethylcelulózy
ESCs	Embryonální kmenové buňky
-F	Fibrin
F-aktin	Fibrilární aktin
FBS	Fetální hovězí sérum
HaCaT	Linie lidských keratinocytů
Hcel® NaT	Komerční produkt ze sodné soli karboxymethylcelulózy
IMM	Objektiv pro imerzní olej, glycerol, voda
iPSCs	Indukované pluripotentní kmenové buňky
OIL	Objektiv pro imerzní olej
PBS	Fosfátový pufr
PCL	Poly-ε-kaprolakton
PE	Polyetylen
PLA/PCL	Kopolymer L-laktidu a ε-kaprolaktonu
PLGA	Kopolymer laktidu a kyseliny glykolové
PS	Polystyren
R _a	Parametr udávající drsnost povrchu
RGD	Aminokyselinová sekvence arginin-glycin-aspartát
RRETAWA	Aminokyselinová sekvence arginin-arginin-glutamát-threonin-alanin-tryptofan-alanin
SD	Směrodatná odchylka
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
Tris-HCl	Tris(hydroxymetyl)aminometan kyseliny chlorovodíkové
TRITC	Tetrametylrhodamin
TUL	Technická univerzita v Liberci

WST-1

4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen
disulfonát

1 Úvod

Tkáňové inženýrství je mladý a rychle se vyvíjející interdisciplinární obor. Jeho cílem je vyvíjet plně funkční náhrady poškozených tkání a orgánů, které budou snadno a neomezeně dostupné, cenově přijatelné, nebudou vyvolávat imunitní odpověď v těle pacienta a budou pro něj komfortní. Mezi nejčastější poranění kůže patří popáleniny, zejména u malých dětí. Dalším problémem jsou chronické rány jako diabetické vředy nebo proleženiny. Tkáňové inženýrství kůže se snaží vyvíjet kožní náhrady a kryty pro léčbu chronických a akutních poranění kůže. Cílem je vyvinout kožní náhradu obsahující buněčné typy, které se v kůži nacházejí, aby byla schopná plně obnovit funkce kůže. Tato náhrada by byla tvořena materiálem, který by sloužil jako nosič buněk, zároveň by podporoval jejich adhezi, růst a produkci mezibuněčné hmoty a signálních molekul. Na tomto nosiči by byly kultivovány autologní kožní fibroblasty, tvořící dermální část kůže a následně keratinocyty, tvořící epidermis. Po implantaci pacientovi do rány by se materiál postupně degradoval a vstřebával do tkáně a buňky by produkcí proteinů mezibuněčné hmoty materiál nahrazovaly, až by došlo k úplnému nahrazení. Materiály sloužící pro tyto účely musí splňovat řadu kritérií. Zásadním požadavkem je necytotoxicita a podpora adheze buněk. Ta může být ovlivněna řadou fyzikálních a chemických parametrů materiálu, například smáčivostí, topografií povrchu, tuhostí nebo vodivostí.

V této práci byla sledována adheze a růst primárních lidských kožních fibroblastů a keratinocytů linie HaCaT na materiálech ze sodné soli karboxymethylcelulózy (Hcel® NaT) ve formě hydrovláken a na nanovlákněných membránách z poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL), z kopolymeru L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu (PLA/PCL) a z acetátu celulózy (AC). Materiály byly dále modifikovány nanesením proteinových vrstev pro zlepšení jejich atraktivity pro adhezi a růst buněk. Byl zvolen kolagen typu I, který je hlavní složkou mezibuněčné hmoty dermis a fibrin, účastnící se hemokoagulace a procesu hojení rány.

2 Literární přehled

2.1 Tkáňové inženýrství

Roku 1993 pan Langer a Vacanti definovali tkáňové inženýrství jako meziobor biologických a technických oborů, který si klade za cíl vyvinout náhrady poškozených tkání a orgánů nebo jejich částí a znovu zajistit, zlepšit nebo udržet jejich funkci (shrnutí v (Langer, 1993)). Toho je dosahováno rozličnými způsoby. Například izolací buněk a jejich implantací do pacienta, kde nahradí nefunkční pacientovi buňky, které neprodukují potřebné signální molekuly. Také se může jednat o implantaci autologních buněk do poškozeného místa, aby došlo k jeho regeneraci. V případě rozsáhlejších poranění jsou buňky kultivovány na materiálech, které slouží jako jejich nosič a poskytují buňkám 3D strukturu a mechanickou oporu. Tyto materiály na sebe mohou mít vázány adhezivní molekuly usnadňující buňkám adhezi nebo růstové faktory a jiné signální molekuly, které se postupně uvolňují do okolí a podporují hojení (shrnutí v (Langer, 1993)). Pokud je potřeba nahradit celý orgán, využívá tkáňové inženýrství tři přístupy. První přístup pracuje s živou tkání, která je decelularizována, aby v pacientovi nedocházelo k imunitní reakci. Pozůstalá tkáň tvořená mezibuněčnou hmotou je následně znovu osídlena buňkami pacienta. Druhý přístup na rozdíl od předešlých metod nevyužívá již předem vytvořeného nosiče z biomateriálu, ze syntetického materiálu či z mezibuněčné hmoty. Pomocí nové technologie 3D biotisku je možné vytvořit celou tkáň od základů. Z analýzy původní tkáně je připraven grafický model, podle kterého je tištěn nový orgán, vrstva po vrstvě. Nepřímý biotisk vytvoří pouze nosič, který je poté osídlen buňkami. S výhodou jsou při nepřímém biotisku použity také signální a adhezivní molekuly. Jejich inkorporace do předem stanoveného místa nebo v koncentračním gradientu, ovlivňuje průběh následného osídlování nosiče buňkami. U přímého biotisku je použita směs již obsahující buňky. To umožňuje buňky lokalizovat specificky a zabraňuje to nerovnoměrnému osídlení nosiče. Třetí přístup kultivuje v 3D podmínkách diferencující se embryonální kmenové buňky (ESCs = embryonic stem cells) nebo indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs = induced pluripotent stem cells). Ty jsou za takových podmínek schopny se samy o sobě uspořádat do architektury daného orgánu a dochází k tvorbě miniorgánů neboli organoidů. Jedná se o uskupení všech buněčných typů, které se v živém orgánu nachází. Miniorgány plní stejnou funkci jako živé orgány (shrnutí v (Ren and Ott, 2014)).

Tkáňové inženýrství vzniklo za účelem zabránit komplikacím, které jsou spojené s dosavadní léčbou. Použití jakékoliv cizí tkáně či buněk původem z jiné osoby (= alogenní transplantát) či zvířete (= xenogenní transplantát) představuje riziko přenosu virů a mikroorganismů na pacienta (shrnutí v (MacNeil, 2007)). Alogenní transplantáty v pacientovi mohou vyvolat

imunitní reakci a následkem toho může dojít k odhojení přijaté tkáně či orgánu. Potlačením imunity pacienta a minimalizací rozdílů mezi antigeny dárce a příjemce lze odhojování oddálit, zmírnit nebo zcela eliminovat (Fahey et al., 1969). Dalším problémem u alogenních transplantací je nedostatek vhodných dárců a dlouhá čekací doba. Mnoho pacientů proto umírá předčasně na selhání orgánu (Delmonico and McBride, 2008). Neuspokojenou poptávku po dárčích orgánech a tkáních řeší xenogenní transplantáty. Pro tyto účely jsou používána prasata, jejichž orgány a tkáně jsou libovolně dostupné a histologií odpovídají lidským. Jak již bylo zmíněno, i zde hrozí riziko přenosu virů a ani dlouhý čas, po který spolu člověk a prase koexistují, nevylučuje možnost reaktivace viru v pacientovi (Goddard et al., 2000). Zásadním problémem ovšem zůstává imunitní i neimunitní reakce na složky přítomné v xenotransplantátu a její akutní povaha (Sprangers et al., 2008). Problémy s přijetím tkáně po imunologické stránce řeší autologní transplantace, používané pro části orgánů a tkání (Cowan et al., 2015; Grimsby and Baker, 2014). Tento přístup se ale mnohdy potýká s nedostatkem vhodného dárčovského místa. Odběr tkáně je zároveň dalším zásahem do organismu, nesoucím rizika spojená s operací (shrnutí v (Supp and Boyce, 2005)). Tkáňové inženýrství hledá nové cesty pro léčbu poškozených tkání a orgánů, které by obešly výše zmíněné komplikace. Zároveň však s sebou přináší nové otázky a zadání, které je potřeba řešit. Jistou výhodou, kterou tkáňové inženýrství přináší, jsou *in vitro* testovací systémy. Tyto systémy simulují živou tkáň ve struktuře i funkci a slouží k testování nových léků z hlediska účinku a toxicity. Použití *in vitro* testovacích systémů snižuje počet potřebných pokusných laboratorních zvířat (Ponec, 2002).

2.2 Adheze buněk na materiál

Tkáňové inženýrství rozeznává několik přístupů z hlediska interakce materiálu s buňkami. První přístup vytváří bioinertní materiály, které nijak neovlivňují prostředí, ve kterém se nachází, a tudíž na ně ani tělo nereaguje a nedochází k imunitní reakci. Pod tím si lze představit materiály, na kterých nedochází k adsorpci proteinů, buňky na ně nejsou schopné adherovat nebo dokonce buňky odpuzují. Tyto vlastnosti se používají u materiálů, které přichází do kontaktu s krví, například cévní náhrady, aby nedocházelo ke vzniku sraženin a trombóz (Baghai et al., 2014; Lee et al., 2002). Druhý přístup vyvíjí bioaktivní materiály. Tento přístup naopak vyžaduje interakci buněk s materiálem a snaží se upravit povrchy materiálů pro snadnou adhezi, proliferaci, diferenciaci nebo třeba migraci buněk. Takové materiály mohou například obsahovat inkorporované růstové faktory, které podporují proliferaci a migraci buněk do rány (Lakshmanan et al., 2016). Kožní tkáňové inženýrství aplikuje tento přístup.

Interakce buněk a materiálu může být nespecifická pomocí slabých vazebných interakcí molekul přítomných na povrchu buňky a materiálu. Nebo může být interakce zprostředkovaná receptorem, kdy specifické proteiny na membráně váží specifické proteiny mezibuněčné hmoty: kolagen, fibronectin, laminin, vitronectin a jiné. Tyto proteiny se na materiál adsorbují z krve a dalších tělních tekutin, nebo *in vitro* podmínkách z kultivačního média. Tato interakce do buňky přenáší signály (shrnutí v (Bačáková et al., 2004)). Kromě hematopoietických a kmenových buněk jsou buňky závislé na adhezi k mezibuněčné hmotě. Po ztrátě kontaktu nedochází k potřebné signalizaci a buňky podstupují programovanou buněčnou smrt zvanou anoikis (Frisch and Ruoslahti, 1997). Interakce je zprostředkována adhezními receptory na membránách buněk (CAMs = cell adhesion molecules) z nichž nejvýznamnější úlohu sehrává rodina integrinů. Dalšími molekulami z rodiny CAMs, které se účastní interakce s mezibuněčnou hmotou, jsou selektiny a syndekany. CAMs na rozdíl od receptorů vzájemných signálních molekul vykazují slabou afinitu k ligandům. Pevnost vazby je dána velkým množstvím receptorů, které se vazby účastní. Malá afinita receptorů buňkám umožňuje snadné rozrušení vazeb a následnou migraci. S tímto jevem se můžeme setkat například při migraci keratinocytů do poraněného místa (Zigrino et al., 2007). Integrinové receptory jsou Ca^{2+} a Mg^{2+} vazebné heterodimery složené z α a β podjednotky. V současné době je známo 24 podjednotek α a 9 podjednotek β . Jejich kombinace určuje specifitu vazby ligandu a tím lokalizuje buňku na správné místo. Konkrétní integrinové receptory váží specifické sekvence aminokyselin přítomné na proteinech mezibuněčné hmoty. Základní sekvencí je arginin-glycin-aspartát (= RGD). Integrin $\alpha_v\beta_3$ váže „RGD“ sekvenci na vitronectinu (Horton, 1997). Přítomnost této sekvence na fibronectinu způsobuje vazbu integrinu $\alpha_5\beta_1$. Integrin $\alpha_2\beta_1$ rozeznává sekvenci aspartát-glycin-glutamát-alanin (= DGEA) na kolagenu (Staat et al., 1991). Konkrétní integrin ale může vázat více sekvencí. Například integrin $\alpha_5\beta_1$ kromě „RGD“ sekvence váže i sekvenci arginin-arginin-glutamát-threonin-alanin-tryptofan-alanin (= RRETAWA) (Humphries et al., 2000). Vazba integrinů na specifickou sekvenci proteinu způsobí jejich agregaci do fokálních adhezí a signalizaci do buňky skrz proteiny vážící aktinový cytoskelet. Mezi tyto proteiny patří talin, vinkulin, α -aktinin, filamin, paxilin, fokální adhezní kináza a další. Interakcí s mezibuněčnou hmotou v buňce dochází ke změnám v buněčném tvaru, proliferaci nebo diferenciaci. Migrující a proliferující buňky vytváří menší množství fokálních adhezí než buňky diferencované (Huang et al., 1998).

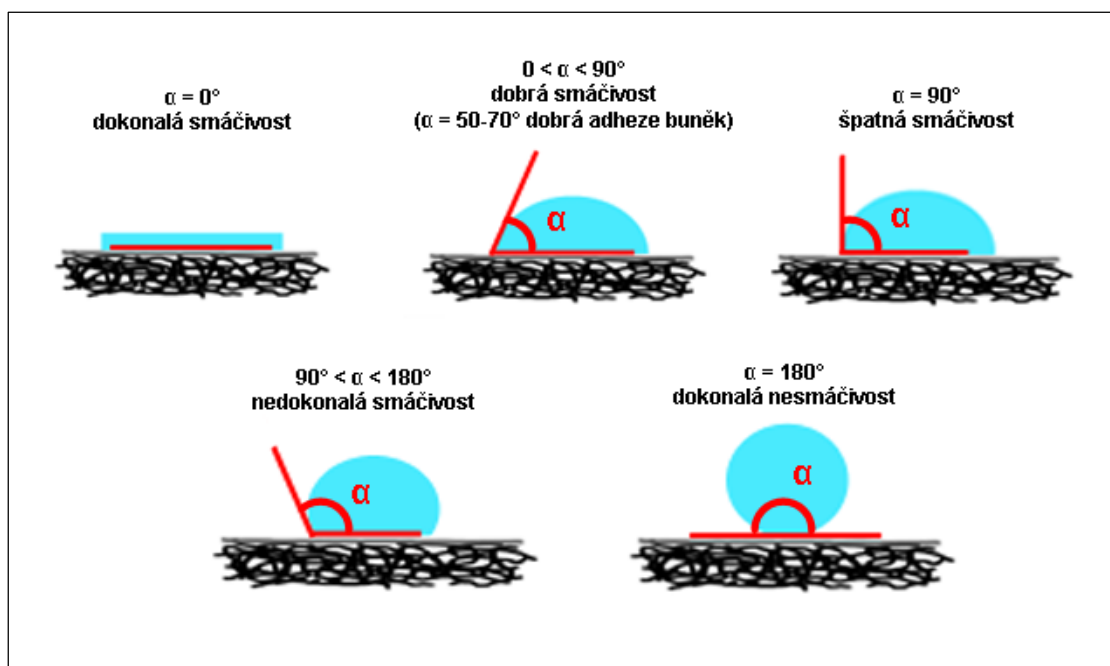
2.3 Fyzikální a chemické vlastnosti materiálů

To, zda se budou na materiály adsorbovat proteiny mezibuněčné hmoty a jak, závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech materiálů. Z množství adsorbovaných proteinů, jejich různorodosti, vzájemném uspořádání a konformaci jednotlivých molekul vyplývá, zda budou na ně schopné adherovat buňky. Materiály proto musí splňovat optimální fyzikálně-chemické vlastnosti, aby byly vhodné pro adhezi buněk. Proteiny musí být ve správné konformaci, aby aminokyselinová sekvence rozpoznávaná integrinovými receptory, byla pro ně přístupná. Toto vše ovlivňují vlastnosti materiálu jako smáčivost, elektrický náboj, vodivost, drsnost povrchu a jeho topografie, tuhost, deformovatelnost, krystalinita, pórovitost, rozpustnost, pH a přítomnost určitých atomů či funkčních skupin (shrnutí v (Bačáková et al., 2004)).

2.3.1 Smáčivost

Smáčivost udává schopnost kapaliny přilnout k pevnému povrchu. Tato vlastnost závisí na chemickém složení materiálu, ze kterého vyplývá jeho povrchové napětí. Povrchové napětí je dáno adhezními a kohezními silami, které působí mezi molekulami na styku rozhraní. Čím polárnější látka je, tím je její smáčivost větší. Přítomnost funkčních skupin obsahujících kyslík na povrchu materiálu zvyšuje jeho polaritu, a tedy i smáčivost (shrnutí v (Bacakova et al., 2011)). Smáčivé materiály označujeme jako hydrofilní, nesmáčivé jako hydrofobní. Smáčivost materiálu lze určit pomocí měření kontaktního úhlu (Obr. 1). Tato hodnota udává sklon tečny ke kapce vůči povrchu materiálu, která je vedená z bodu rozhraní materiál-kapka-vzduch. Velký kontaktní úhel znamená malou smáčivost (velkou hydrofobicitu) a naopak. Pokud je materiál příliš hydrofilní, nebo příliš hydrofobní, buňky na něj nejsou schopné adherovat. Ideální smáčivost pro adhezi buněk odpovídá velikosti kontaktního úhlu v rozmezí 50° – 70° (Slepickova Kasalkova et al., 2015).

Většina používaných syntetických materiálů je příliš hydrofobní. Proteiny mezibuněčné hmoty se adsorbují v denaturovaném stavu a neposkytují buňkám vazebné sekvence (shrnutí v (Bacakova et al., 2011)). Za účelem zvýšení smáčivosti lze povrch těchto materiálů upravit, například působením plazmového výboje (Duske et al., 2012), UV-zářením (Heitz et al., 2003) nebo zavedením iontů (Bacakova et al., 2000).



Obr. 1 Smáčivost materiálu měřená kontaktním úhlem. Tato hodnota udává sklon tečny ke kapce vůči povrchu materiálu, která je vedena z bodu rozhraní materiál-kapka-vzduch. Čím větší kontaktní úhel, tím méně smáčivý (více hydrofobní) materiál je.

2.3.2 Drsnost a topografie

Velká drsnost povrchu materiálu neumožňuje buňkám rozprostírat se, ale příliš hladké povrchy pro ně také nejsou ideální. Drsnost se nejčastěji udává jako parametr R_a , který udává průměrnou výšku jednotlivých nerovností. Kromě velikosti nerovností je důležitá i jejich frekvence a tvar. Například ostré výčnělky mohou buňky mechanicky poškodit. Drsnost je členěna na čtyři kategorie: makrodrsné povrchy (100 μm a více), mikrodrsné povrchy (1 μm – 100 μm), submikrodrsné povrchy (100 nm – 1 μm) a nanodrsné povrchy (100 nm a méně), (shrnuto v (Bacakova et al., 2011)). Makrodrsné povrchy jsou favority pro dobrou adhezi buněk. Rozměry nerovností jsou dostatečně velké pro adhezi buněk na nich i mezi nimi (Santander et al., 2014). Zároveň jsou vhodné pro použití u kostních náhrad, kde napomáhají ukotvit implantát do tkáně (Gotfredsen et al., 2000). Naproti tomu mikrodrsné a submikrodrsné povrchy svými rozměry neposkytují buňkám dostatečně velký povrch pro rozprostření se a názory na jejich vhodnost pro adhezi buněk se v literatuře liší. Nesoulad může být způsoben odlišnou frekvencí a tvarem nerovností a také ostatními faktory, například smáčivostí, které kromě velikosti drsností hrají roli při adhezi buněk (shrnuto v (Bacakova et al., 2011)). Nanodrsnost povrchu je považována za důležitý faktor pro adhezi buněk. Tento typ drsnosti vykazuje dobré výsledky, například pro adhezi osteoblastů. Důvodem může být preferenční adsorpce vitronektinu, který je, na rozdíl od ostatních

proteinů mezibuněčné hmoty, menších rozměrů. Jeho velikost mu umožňuje adsorpci na nanodrsnosti ve správné konformaci, která poskytuje vazebnou sekvenci pro osteoblasty (Webster et al., 2000). Druhou důležitou vlastností nanodrsných povrchů je snížená aktivace imunitních buněk, a tudíž i snížená exprese prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Saino et al., 2011). Úprava drsnosti povrchu je možná metodou tryskání nebo pomocí plazmatu (Gotfredsen et al., 2000; Reznickova et al., 2015).

2.3.3 Elektrický náboj a vodivost

Elektrický náboj materiálu může pozitivně, nebo negativně, ovlivnit adhezi buněk. Neboť proteiny mezibuněčné hmoty jsou záporně nabitě, jsou přitahovány k povrchům majícím kladný náboj. Pokud materiál nese záporný náboj, nedochází k adsorpci proteinů mezibuněčné hmoty a k adhezi buněk na materiál. Toho se využívá u materiálů, které přichází do kontaktu s krví. Přidání záporně nabitě sulfonové skupiny způsobí, že materiál odpuzuje buňky a proteiny přítomné v krvi a nedochází k ucpávání cév a ke vzniku trombózy (Lee et al., 2002). Na druhou stranu přítomnost záporného náboje nemusí vždy znamenat špatnou adhezi buněk, neboť ta je ovlivňována i mnoha jinými faktory (shrnuto v (Bacakova et al., 2011)). Přítomnost karboxylové skupiny na materiálu s sebou přináší záporný náboj, ale zároveň zvyšuje polaritu materiálu, a tedy i jeho smáčivost, která podporuje buněčnou adhezi (Bet et al., 2003). Další výhodou této funkční skupiny je schopnost vázat růstové faktory a jiné molekuly podporující adhezi a proliferaci buněk (von Recum et al., 1999). V součtu mohou kladné vlastnosti materiálu převážet nad zápornými a buňky mohou proliferovat i na materiálu se záporným nábojem.

Vodivost materiálu stimuluje adhezi a růst excitovatelných buněk. Dokonce i bez ohledu na to, zda jsou buňky stimulovány elektrickým proudem. Při stimulaci buněk elektrickým proudem nebo elektromagnetickým polem je dosahováno o to lepší adheze a proliferace buněk. Stimulace buněk srdeční svaloviny aktivuje receptory spřažené s fosfolipázou C, která štěpí membránový fosfolipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát za vzniku diacylglycerolu a fosfatidylinositolu-1,4,5-trisfosfátu. Fosfatidylinositol-1,4,5-trisfosfát způsobí zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{2+} , což odpovídá fyziologickým podmínkám při srdeční kontrakci. Signalizace Ca^{2+} spouští expresi genů pro buněčný růst a diferenciaci a také mění konformaci integrinových receptorů (Khatib et al., 2004). Elektricky vodivých materiálů lze dosáhnout UV-zářením, plazmatem nebo proudem iontů, které vytvoří řetězec uhlíků s vodivými konjugovanými dvojnými vazbami. Další možností je použít příměs sazí (shrnuto v (Bacakova et al., 2011)).

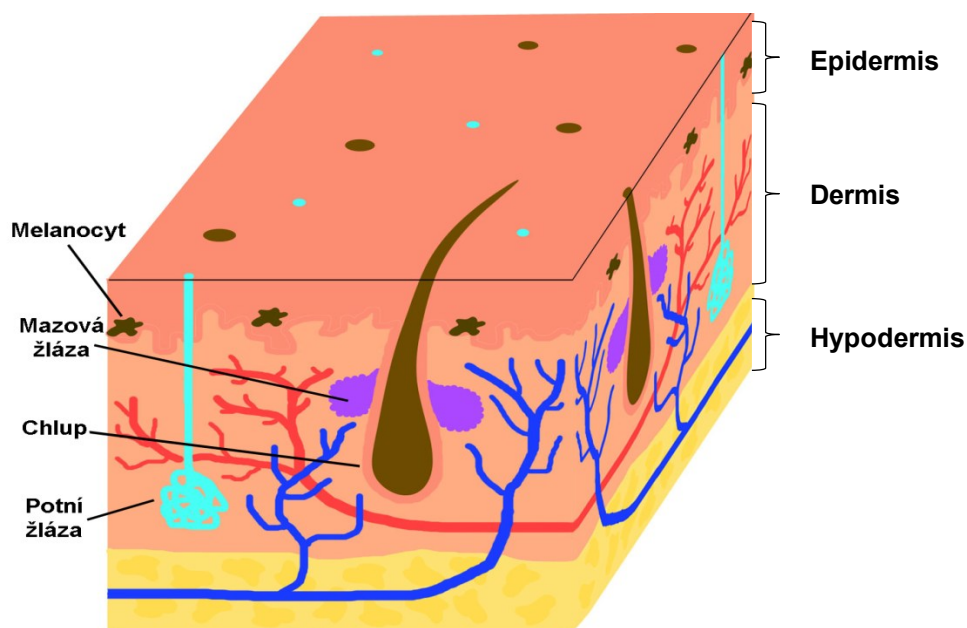
2.3.4 Tuhost a deformovatelnost

Bylo dokázáno, že příliš elastické, měkké nebo deformovatelné materiály nejsou vhodné pro adhezi buněk. Integrin $\alpha_2\beta_1$ vázající kolagen, není na příliš měkkém a elastickém podkladě schopen vytvořit kontakt s materiálem. To způsobí snížení exprese proteinů fokální adheze a zvýšení exprese proteázy calpain, která degraduje složky cytoskeletu (Wang et al., 2003). Buňky migrují z elastických míst do tužších a čím tužší materiál je, tím rychleji migrují (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2008). Pravděpodobná příčina neschopnosti vytvářet fokální adheze spočívá v trakčních silách buňky. Proteiny mezibuněčné hmoty adsorbované na příliš elastický materiál špatně odolávají trakčním silám, kterými na ně buňky působí a odloučí se z povrchu (shrnutí v (Bacakova et al., 2011)).

Zajímavým zjištěním je, že tuhost materiálu ovlivňuje fenotyp buňky. Na velmi měkkých materiálech diferencují mezenchymální kmenové buňky do neuronů. Na méně měkkých diferencují do svalových buněk a na tuhých do osteoblastů. Buňka reaguje na tuhost vnějšího prostředí tvorbou větších trakčních sil, které odpovídají buňkám tužší tkáně (Engler et al., 2006).

2.4 Anatomie a funkce kůže

Kůže představuje největší orgán našeho těla, pokrývající vnější povrch organismu. U průměrného dospělého člověka zaujímá plochu 1,6 – 2 m² a představuje přibližně 16 % tělesné hmotnosti. Tento údaj se liší v závislosti na množství podkožního tuku. Tloušťka kůže se v průměru pohybuje kolem 1 – 2 mm podle oblasti těla. Může však nabývat i větších hodnot, například na chodidlech nebo zádech, kde dosahuje tloušťky až 4 mm. Zároveň také nalezneme oblasti s tloušťkou 0,5 mm, například na očních víčkách nebo temeni hlavy, které disponují nejtenčí kůží na těle. Poloha kůže na povrchu těla již napovídá její zásadní funkci v poskytování mechanické bariéry oddělující organismus od vnějšího prostředí a umožňující ochranu těla před škodlivými látkami, zářením, patogeny, ale i příjmem nadměrného množství vody a ztrátou tělních tekutin. Zároveň zprostředkovává termoregulaci, exkreci, senzorickou a endokrinní funkci, imunitní reakci a slouží jako zásobárna tuků a vody. Kůže je tvořena dvěma hlavními částmi: epidermis (pokožka) a dermis (škára). Na dermis navazuje hypodermis (podkožní vazivo), která není do kůže zahrnována (Obr. 2).



Obr. 2 Schéma anatomie kůže. Vyznačené části kůže: epidermis, dermis a podkožní část hypodermis. Na schématu jsou znázorněny melanocyty v epidermální části, cévní řečiště a kožní deriváty v dermální části kůže.

2.4.1 Epidermis

Nejsvrchnější vrstva kůže, epidermis, je složena z 90 % z keratinocytů. Jedná se o buňky ektodermálního původu, dlaždicového typu, které tvoří tenký vrstevnatý rohovatějící epitel. Dále se v epidermis nachází melanocyty, původem z neurální lišty, které tvorbou pigmentu, melaninu, chrání organismus před škodlivým UV-zářením. Melanin je prostřednictvím dlouhých výběžků melanocytů transportován do keratinocytů, kde obklopuje jádro a chrání ho před vysokými dávkami energie. Zároveň v epidermis nalezneme Langerhansovy buňky, které zastupují imunitní systém v kůži. Fagocytují mikroorganismy vstupující do kůže a jejich antigeny prezentují T-lymfocytům, které tím aktivují. Posledním typem buněk jsou Merkelovy buňky, které slouží jako mechanoreceptory. Co v epidermis naopak nenajdeme je cévní řečiště. Kyslík a živiny k buňkám epidermis pronikají z dermální části kůže (shrnutí v (McLafferty et al., 2012)).

Epidermální vrstva je dělena na 5 podvrstev, které se od sebe liší morfologií a pozicí buněk korelující se stádiem zralosti buněk. Buňky epidermální vrstvy vznikají dělením kmenových buněk ve Stratum basale. Postup buněk do dalších vrstev, vzdálenější od dermis má za následek nedostatečný přísun živin a odumírání buněk. Buňky současně prochází procesem keratinizace, kdy syntetizují fibrilární protein keratin, řadící se mezi intermediální filamenta. Keratin kůži poskytuje ochrannou funkci a účastní se mezibuněčných spojů

desmozomů. Posledním stádiem buňky je korneocyt, který je již plně keratinizován a jeho jádro a ostatní orgány zanikly. Odlupování korneocytů z nejsvrchnější vrstvy kůže musí být kompenzováno vznikem nových buněk ve Stratum basale. Narušení této rovnováhy má za následek vznik některých kožních onemocnění, jako je například psoriáza. Život buňky putující od místa svého vzniku po nejsvrchnější vrstvu trvá přibližně 28 dní (shrnuto v (McLafferty et al., 2012)).

Zárodečná vrstva epidermis, Stratum basale, je tvořena jedinou řadou cylindrických keratinocytů. Ty jsou připojeny na bazální membránu pomocí hemidesmozomů a fokálních adhezí. S malou četností ve Stratum basale nalezneme i vmezeřené melanocyty a Merkelovy buňky. Přesun do další vrstvy, Stratum spinosum, pro buňky znamená ztrátu schopnosti se dělit a mění se jejich morfologie v zakulacený a zašpičatělý tvar. Buňky si mezi sebou začínají vytvářet mezibuněčné spoje, desmozomy. Dynamicky je ruší a opět znovu vytváří podle potřeby, jak putují vrstvou. Desmozomy mají podíl na fyzikálních vlastnostech kůže, která je pružná, roztažitelná, ale přitom pevná. Stratum spinosum je jediná vrstva, kde nalezneme také Langerhansovy buňky. Stratum granulosum je část epidermis, kde dochází k apoptóze buněk a vyplnění cytoplazmy keratinem. Ztráta jádra umožní zploštění a protažení buněčného tvaru. V této fázi u buněk dochází k sekreci lipidů z lamelárních tělísek do mezibuněčného prostoru. Lipidy tvoří nepropustnou bariéru, zabráňující vysychání buněk a drží je pospolu. Mezistupněm mezi Stratum granulosum a poslední vrstvou Stratum corneum je Stratum lucidum. Tato vrstva je přítomná pouze v oblastech, kde má kůže tlustší charakter, jako jsou dlaně a chodidla, a přispívá k voděodolnosti kůže. Nejsvrchnější vrstva Stratum corneum je složená ze zploštělých odumřelých keratinocytů nazývaných korneocyty. Na rozhraní s okolním prostředím dochází k jejich odlupování v podobě šupin či jednotlivě. Při mechanickém tření kůže se Stratum corneum zvětšuje a vzniká mozol (shrnuto v (McLafferty et al., 2012)).

2.4.2 Dermis

Epidermis a dermis od sebe odděluje bazální membrána, která v těle separuje epitelovou a pojivovou tkáň. Hranice mezi epidermální a dermální částí není rovná, ale tvořená záhyby nazývanými papilární linie. Tyto nerovnosti pomáhají držet epidermis a dermis při sobě a také usnadňují výměnu látek mezi nimi. Dermis kromě zprostředkování výživy poskytuje epidermis i fyzickou podporu. Dojde-li k mechanickému oddělení epidermální vrstvy od dermální, vyplní se vzniklý prostor tkáňovou tekutinou a vzniká puchýř. Dermis se skládá ze dvou částí - retikulární a papilární vrstvy. V retikulární vrstvě nalezneme kolagenní a elastická vlákna tvořící hustou síť, která kůži dává její mechanickou pružnost a pevnost v tahu. V papilární části se nachází nervy, cévy vyživující kůži, žlázy a vlasové folikuly (shrnuto

v (McLafferty et al., 2012)). Cévy dermis prorůstají v hlubší části sousedící s hypodermis a ve vrchnější části sousedící s epidermis. Mezi tyto dva hlavní svazky vybíhají postranní cévy vyživující vlasové folikuly, potní a mazové žlázy (shrnutí v (Kolarsick et al., 2011)).

Hlavním typem buněk dermis jsou fibroblasty. Jedná se o buňky mezenchymálního původu, protáhlého tvaru, které produkují proteiny tvořící výplň dermální části kůže. Těmito proteiny jsou kolagen, elastin, laminin, fibronectin a další. Fibroblasty hrají důležitou roli ve vývoji a při regeneraci poškozené tkáně produkcí cytokinů a růstových faktorů. Tento typ buněk je výjimečný svojí expresí genů. Nedochází u nich totiž k expresi společných markerů charakterizujících tento buněčný typ. Dokonce bylo zjištěno, že expresní profil genů se liší dle anatomického původu fibroblastů. Liší se nejenom fibroblasty z rozdílných částí těla, ale i z odlišné hloubky dermis a odlišného kontextu okolních buněk (Rinn et al., 2006).

Základní složkou mezibuněčné hmoty dermis je kolagen. Je to ve vodě nerozpustný skleroprotein. U savců se jedná o nejvíce zastoupený protein v těle. Aminokyselinová sekvence je charakteristická konzervovaným glycinem na každé 3. pozici helixu a také částečně konzervovaným prolinem na pozici za glycinem a hydroxyprolinem na pozici před glycinem. K hydroxylaci prolinu dochází až extracelulárně. Potřebným kofaktorem pro tuto reakci je vitamín C. Tyto aminokyseliny určují specifickou strukturu kolagenu v podobě trojšroubovice. Trojšroubovice se spojují do větších svazků, které jsou charakteristické svojí pevností. Kolagen tvoří početnou rodinu proteinů mezibuněčné hmoty. Existují dvě formy kolagenu: fibrilární a nefibrilární. Mezi fibrilární patří kolagen typu I, který tvoří 90 % kolagenu zastoupeného v kůži. Také sem patří kolagen typu III a V. Mezi nefibrilární se řadí kolageny, které tvoří retikulární síť, bazální membránu a pomáhají zpevnit síť z fibrilárních kolagenů. Zástupci jsou například kolagen typu IV, VI, VII a XIV. Celkem je známo 28 druhů kolagenů (shrnutí v (Tracy et al., 2016)).

2.4.3 Hypodermis

Pod dermální částí kůže se nachází hypodermis, tvořená tukovými buňkami a vazivem. Slouží jako tepelná izolace, ochrana těla před mechanickým poškozením a zásobárna energie a vitamínů rozpustných v tucích (shrnutí v (Kolarsick et al., 2011)).

2.5 Léčba kožních poranění

Kůže je komplexní orgán s hojným počtem funkcí. Pokud dojde k jejímu poškození je narušena bariéra mezi tělem a vnějším prostředím a může dojít k infekci. Při rozsáhlých poraněních může být pacient ohrožen na životě. Poranění můžou být akutní, nebo chronická.

Mezi akutní poškození kůže patří například pooperační rány nebo popáleniny, které jsou nejčastějšími poraněními kůže ohrožující život pacienta. Nejvíce jsou zastoupeny popáleniny dětí vařící vodou nebo párou. Dalším častým kožním problémem jsou chronické bérkové vředy, diabetická noha či proleženiny. Léčba pomocí kožních krytů a náhrad zlepšuje kvalitu života pacienta a snižuje jejich úmrtnost. Roku 1871 byla provedena první kožní transplantace (Alrubaiy and Al-Rubaiy, 2009). Dalším významným milníkem v historii léčby kožních poranění byla kultivace lidských keratinocytů na podkladové vrstvě z myších umrtvených fibroblastů (Rheinwald and Green, 1975). A o 6 let později, roku 1981, byla poprvé použita kultivace autologního epitelu ke krytí popáleniny (Alrubaiy and Al-Rubaiy, 2009). Pro adekvátní léčbu a vývoj vhodných krytů ran a kožních náhrad je potřeba znát fyziologický proces hojení.

Hojení rány se odehrává ve třech hlavních etapách. V první fázi probíhá čištění rány. Akumulace krevních destiček v místě poškození přitahuje kožní fibroblasty a bílé krvinky. Ty mají za úkol ránu pročistit od případných mikroorganismů a zbytků odumřelé tkáně. V další fázi dochází ke značné proliferaci keratinocytů, které přerůstají do dermální části rány. Zde dochází k angiogenezi a produkci kolagenu fibroblasty. Tvoří se tak zvaná granulační tkáň, která je novým podkladem pro další proliferaci keratinocytů. V konečné fázi hojení dochází k dokončení epitelizace rány a tvorbě jizvy. Po delší čas ještě dochází k přestavbě tkáně a mezibuněčné hmoty (shrnutí v (Gurtner et al., 2008)).

Před započatím léčby je nutné ránu klasifikovat a zvolit vhodnou léčbu. Rána musí být zbavena infekce a zbytků mrtvé tkáně. Pokud k tomu nedojde samovolným procesem, musí být použita chirurgická, mechanická, chemická nebo biologická cesta (shrnutí v (Broussard and Powers, 2013)).

2.5.1 Kožní kryty

Kožní kryty mají za cíl podporovat hojení ran a jsou pouze dočasným řešením. Slouží jako bariéra před vniknutím mikroorganismů a zároveň zamezují přístupu kyslíku. Následkem toho dochází k rychlejšímu hojení indukci angiogeneze, produkcí cytokinů a růstových faktorů, expresí proteinů účastnících se buněčných spojů a produkcí mezibuněčné hmoty. V ráně dochází k vylučování exsudátu, který obsahuje látky podporující hojení. Kožní kryty by proto měly v ráně udržovat tuto vlhkost, která je zároveň důležitá pro migraci keratinocytů při procesu re-epitelizace. Pokud však rána vylučuje nadměrné množství exsudátu, je potřeba jej částečně odvádět, aby nedocházelo k maceraci tkáně. Materiál samozřejmě nesmí působit toxicky (shrnutí v (Broussard and Powers, 2013)). Vlastnosti ideálního kožního krytu shrnuje (Tab. 1).

Základní vlastnosti	Podpora hojení	Snižování rizika infekce
<ul style="list-style-type: none"> - Snadná aplikace a ošetřování - Netoxický, nealergenní - Cenově dostupný - Snadno skladovatelný - Estetický 	<ul style="list-style-type: none"> - Udržování vlhkosti - Umožňování výměny plynů - Zadržování tepla - Zamezení traumatizace či macerace tkáně 	<ul style="list-style-type: none"> - Absorpce exsudátu - Odstraňování nekrotické tkáně - Zabránění vnější kontaminaci

Tab. 1 Shrnutí vlastností ideálního kožního krytu. Převzato a upraveno z (Broussard and Powers, 2013).

Kožní kryty můžeme dělit podle jejich původu na biologické a umělé. Mezi biologické kryty se řadí alogenní nebo xenogenní transplantáty a amniová blána. U xenotransplantátů dochází v rámci dnů k jejich odhojení, u alotransplantátů do 2 týdnů. Musí být proto často měněny za nové a slouží pouze dočasně. Decelularizace alogenních transplantátů umožňuje jejich použití trvale. Jejich omezený zdroj ale vedl k vývoji geneticky modifikovaných prasat, jejichž štěpy nejsou odhojovány hyperakutně, ale se stejnou rychlostí jako alotransplantáty (Leto Barone et al., 2015). Amniová blána se při popáleninách kůže používá již od roku 1910. Pomáhá urychlovat hojení, snižuje bolest a riziko infekce a dobře se s ní manipuluje. Hrozí zde ale riziko přenosu nemocí a infekce a musí být často měněna za novou (Halim et al., 2010).

Prvním používaným umělým krytem byla gáza. Vytváří bariéru pro okolní prostředí, je levná a snadno dostupná. Ale neudrží vlhkost a přisychá k ní. Při výměně krytu tak dochází ke strhávání tkáně. Toho se využívá při mechanickém čištění rány od infekce a mrtvé tkáně. V dnešní době je gáza používána u malých dobře se hojících poranění nebo jako sekundární fixující krytí. Pokud je rána infikovaná pouze povrchově, používají se materiály s antimikrobiálními účinky. Jedná se o materiály obsahující stříbro, jód nebo medicínální med (shrnutí v (Broussard and Powers, 2013)).

Přednost dnes mají materiály udržující vlhkost, tak zvané vlhké krytí. Patří sem polyuretanové filmy, které jsou tenké, elastické, přizpůsobivé ráně a dobře na ni adherují. Jejich průsvitný vzhled umožňuje snadné kontrolování rány. Nevýhodou je neschopnost odsávat přebytečný exsudát. Dalším typem vlhkého krytí jsou hydrogely. Jedná se o hydratované polymery obsahující až 96 % vody. Jsou využívány pro hydrataci suchých ran, mají chladicí efekt a snižují bolest. Pozbývají ale adhezivní vlastnosti, proto musí být k ráně připevněny sekundárním krytím. Mezi kryty schopné absorbovat nadbytečný exsudát patří hydrokoloidy. Jsou dostupné ve formě hydrofilmů, pasty nebo zásypu a při styku s tekutinou vytváří gel. Kromě absorpce exsudátu stimulují čištění rány. Hydrokoloidy ve formě hydrofilmů mají dobré adhezivní vlastnosti a na rozdíl od ostatních forem nepotřebují

sekundární krytí. Podobně jako hydrokoloidy, i pěnové kryty jsou schopné absorpce exsudátu. Některé typy vyžadují sekundární fixační kryt pro umístění na ránu. Algináty jsou vyráběny z polymerů mořských řas. Výměnou vápenatých iontů se sodnými ionty z rány vzniká alginátový gel. Vápenaté ionty v ráně podporují hemostázu. Toto vlhké krytí velmi absorbuje tekutiny z rány, ale pokud není do týdne měněno, hrozí jeho vysušení a přischnutí k ráně. Posledním typem vlhkého krytí jsou hydrovlákna vyráběná ze sodné soli karboxymethylcelulózy. Jejich absorpční schopnost je ještě větší než u alginátů a zároveň podporují čištění rány. Vhodné užití je pro hluboké rány, do kterých jsou schopné se složit (shrnutí v (Broussard and Powers, 2013)). Přehled použití jednotlivých typů syntetických krytů a jejich dostupných zástupců je uveden v (Přílohy - Tab. 5).

2.5.2 Kožní náhrady

Při rozsáhlých a hlubokých poranění kůže nejsou kryty dostačující pro její zahojení. Proto jsou vyvíjeny kožní náhrady, které mají za úkol simulovat prostředí živé tkáně a postupně mají být nahrazeny mezibuněčnou hmotou. Materiály sloužící jako kožní náhrada nesmí být toxické a vyvolávat imunitní reakci. Měly by podporovat hojení a inhibovat zánětlivé faktory vyvolávající vznik jizvy. Zároveň by měly mít 3D architekturu odpovídající živé tkáni a měly by být biodegradabilní a bioresorbovatelné. Tento proces by měl nastat nejdříve za 3 týdny, aby stihlo dojít k dostatečné angiogenezi v dermální části a osídlení rány fibroblasty a keratinocyty (shrnutí v (Halim et al., 2010)). Další požadavky na vlastnosti kožních náhrad jsou ve shrnující tabulce (Tab. 2).

Požadavky na vlastnosti kožní náhrady	
- Netoxická	- Přizpůsobivá tloušťce a tvaru rány
- Nevyvolávající imunitní reakci	- Snadno skladovatelná
- Chránící před infekcí	- Široce dostupná
- Biodegradabilní a bioresorbovatelná	- Odolávající střížným silám
- Zabraňující ztrátám vody	- Bránící vzniku jizvy
- Cenově dostupná	- Obsahující všechny typy buněk a funkčních
- Dlouhá životnost	jednotek
- Snadná aplikace	

Tab. 2 Shrnutí požadavků na vlastnosti ideální kožní náhrady. Převzato a upraveno z (Halim et al., 2010).

Náhrady zpravidla obsahují kultivované buňky pacienta nebo dárce. Podle toho se dělí na náhrady s autologními buňkami, náhrady s alogenními buňkami případně na bezbuněčné náhrady. Můžeme je dělit na biologické, syntetické a biosyntetické. Biologickou a nejstarší

používanou kožní náhradou je autologní transplantát. Jeho použití ale vytváří další poškozené místo a následně jizvu. Při rozsáhlých popáleninách bývá nedostatek dárcovského místa, proto došlo k vývoji syntetických náhrad. Ty jsou založené na uměle připraveném materiálu, který simuluje architekturu tkáně a slouží jako nosič pro buňky. Další způsob členění je podle tloušťky náhrady na epidermální, dermální, dermoepidermální nebo náhrady v plné tloušťce obsahující přilehlé svalstvo a cévy.

Mezi epidermální náhrady patří Epicel®. Jedná se o keratinocyty pěstované na gáze, která je modifikovaná vazelínou. Po namnožení keratinocytů do potřebných rozměrů je náhrada přišita do rány a keratinocyty přirůstají k živé tkáni. Postupem času je gáza z těla odloučena. Je to jediná kožní náhrada vyžadující odběr tkáně pacienta, ale oblast o rozměrech 1 x 1 cm stačí pro vytvoření epidermální náhrady pro většinu povrchu těla. Kultivace keratinocytů je časově náročná a použití náhrady bývá možné až za několik týdnů po odběru buněk. Další nevýhodou je snadné mechanické poškození, vysoké náklady a omezená doba uchovávání (Broussard and Powers, 2013).

Jako dermální náhrada slouží například AlloDerm® získávaný decelularizací alotransplantátu a odstraněním epidermální vrstvy. Díky odstranění antigenů nevyvolává imunitní reakci a umožňuje tvorbu cév a osídlení fibroblasty (Alrubaiy and Al-Rubaiy, 2009). MatriDerm® je hovězí kolagen I s elastinem zachovaný ve své původní struktuře. Jeho výhodou je vstřebatelnost a díky své pružnosti brání kontrakci rány (Halim et al., 2010). Mezi dvouvrstvé náhrady patří například Hyalomatrix®. Dolní vstřebatelná vrstva je tvořena kyselinou hyaluronovou, která podporuje hojení rány a vnější bariéru tvoří silikonová membrána. Na rozdíl od kolagenu je kyselina hyaluronová vysoce konzervovaná mezi organismy (Halim et al., 2010). Dalším typem je náhrada Biobrane®, která slouží jako rychlé, dočasné řešení. Jedná se o dvouvrstvou náhradu obsahující xenogenní látku. Na vnější silikonovou vrstvu je navázána vnitřní nylonová síť obohacená o prasečí kolagen, který zajišťuje přilnutí k ráně. Nylonová síť slouží jako matrice pro fibroblasty a endotelové buňky. Silikonová vrstva tvoří bariéru pro mikroorganismy a brání odpařování vody. Po vytvoření cévního zásobení je Biobrane® odstraněna (Alrubaiy and Al-Rubaiy, 2009). V minulosti byl zaznamenán případ syndromu toxického šoku, při použití náhrady Biobrane®, patrně díky akumulaci exsudátu (Weinzweig et al., 1994). Na podobném principu jako Biobrane® funguje Integra®. Vnější bariérou je opět silikon a vnitřní část tvoří hovězí kolagen se žraločím chondroitin-6-sulfátem. Po 2 – 3 týdnech dochází k obnovení dermis a silikonová vrstva je nahrazena dermoepidermálním štěpem. Stejně jako u Biobrane® je i u Integry® riziko infekce a následného toxického šoku. Oproti jiným náhradám ale dosahuje lepších estetických výsledků. Biodegradabilní náhradou je Dermagraft®. Na polyglykolové kyselině jsou

kultivovány novorozenecké fibroblasty předkožky. Po 3- 4 týdnech dochází ke vstřebání materiálu. TransCyte® spojuje vlastnosti Biobrane® a Dermagraftu®. Základní složkou je nylonová síť na silikonové membráně. Na nylonové vrstvě jsou kultivovány novorozenecké fibroblasty předkožky, které urychlují hojení rány. Po několika týdnech je materiál odloučen případně chirurgicky odstraněn (Alrubaiy and Al-Rubaiy, 2009).

Epidermální ani dermální náhrady nedosahují takových výsledků jako dermoepidermální náhrady (Idrus et al., 2014). Dermoepidermální náhrady obsahují buňky dermis (fibroblasty) i epidermis (keratinocyty). První schválenou náhradou byl Apligraf® složený z hovězího kolagenu I nesoucího neonatální fibroblasty. Poté, co fibroblasty vyprodukují dostatečné množství kolagenu, jsou nanášeny neonatální keratinocyty. Kultivací na rozhraní vzduch – kapalina je indukována jejich diferenciací v jednotlivé vrstvy pokožky. Stejný princip a složení využívá i náhrada OrCel® (Alrubaiy and Al-Rubaiy, 2009; Halim et al., 2010).

Přehled použití vybraných typů kožních náhrad v klinické praxi je uveden v (Přílohy – Tab. 6). Ideální by bylo, aby dermoepidermální náhrady zahrnovaly cévy, nervy, melanocyty a další typy buněk a funkčních jednotek, které obsahuje zdravá kůže. Takové náhrady již existují, ale zatím slouží pouze jako *in vitro* testovací systémy ve farmacii (Ponec, 2002).

2.6 Materiály pro kožní tkáňové inženýrství

Materiály, které přichází do kontaktu s buňkami, musí být biokompatibilní, bioresorbovatelné nebo bio-odolné (Hua et al., 2016). Nesmí být toxické a musí být dostatečně pevné, aby byly pro buňky podporou. Jejich 3D architektura by měla vystihovat stavbu kůže. Jak již bylo uvedeno výše, musí splňovat řadu podmínek, fyzikálně-chemických vlastností, umožňovat výměnu látek a buňkám komunikaci skrz póry (BaoLin and Ma, 2014). Mezi přírodní materiály zařazujeme kolagen, fibronectin, chitosan, hyaluronan, polypeptidy, hydroxyapatit, glykosaminoglykany, algináty, celulózu, škrob nebo chitin. Mezi syntetické materiály patří například poly-ε-kaprolakton, poly-L-laktid, polyglykolová kyselina či polyetylglykol (shrnutí v (Mohamed and Xing, 2012)).

2.6.1 Celulózové materiály

Celulóza je nejhojněji zastoupený přírodní polymer na světě. Ročně jí vzniká několik biliónů tun (McNamara et al., 2015). Je to stavební homopolysacharid složený z glukózových podjednotek se sumárním vzorcem $(C_6H_{10}O_5)_n$. Celulóza je složená z lineárních nevětvených řetězců obsahujících stovky až tisíce $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou vázaných β -D-glukopyranózových monomerů. Jeden konec řetězce je neredukující a druhý je redukující,

chemicky modifikovatelný. Tento polysacharid je zcela nerozpustný ve vodě. Je to chirální a biodegradabilní molekula, ale většina živočichů kvůli absenci enzymů štěpících β -glykosidickou vazbu neumí celulózu trávit. Výjimkou je třeba hlemýžď zahradní. Býložravci sice celulózu trávit neumí, ale mají v trávicím traktu symbiotické bakterie, které exprimují enzymy potřebné pro štěpení celulózy. Celulóza byla poprvé objevena a izolována Payenem začátkem 18. století. Je hlavní složkou primární buněčné stěny rostlinných buněk a spolu s hemicelulózami, pektiny a ligninem se podílí na stavbě sekundární buněčné stěny. Je syntetizována enzymatickým komplexem celulózasyntáza na plazmatické membráně rostlinné buňky. Tento komplex syntetizuje současně 30 - 200 řetězců celulózy, které jsou ihned spojovány do mikrofibril (McNamara et al., 2015). Polární hydroxylové skupiny glukózové podjednotky tvoří dva vodíkové můstky s hydroxylovými skupinami sousedních řetězců. Tím se mikrofibrily shlukují do krystalů, které dávají celulóze velkou pevnost (O'Sullivan, 1997). Mikrofibrily se váží na buněčnou stěnu a obtáčí buňku v jednom směru, který určuje celulózasyntáza. Ve směru kolmém na vlákna celulózy se může buňka prodlužovat. Bavlna je nejčistší forma rostlinné celulózy o obsahu 90 %, ve dřevě je zastoupena z 50 %. Dále se získává z konopí, lnu, juty, ramie, kapoku, kokosu, agáve, ananasu, kopřivy, aloe nebo rašeliny. Nejčastěji se však izoluje ze dřeva. Kromě vyšších zelených rostlin najdeme celulózu i u řas, hub a pláštěnců. Některé rody bakterií (*Gluconacetobacter*) také umí syntetizovat celulózu a používají ji na tvorbu biofilmů. Bakteriální nanocelulóza je jednou z nejpevnějších biomolekul a na rozdíl od rostlinné celulózy neobsahuje příměsi dalších polysacharidů. Tento důvod ji činí velmi atraktivní pro široké využití (Lee et al., 2014). Celulóza je již řadu let využívána pro výrobu papíru, textilních výrobků, stavebních materiálů, celofánu nebo umělého hedvábí. V současné době je snaha o využití celulózy jako paliva, zdroje obnovitelné energie nebo v biomedicínských oborech (Vermerris and Abril, 2015). Celulóza může být chemicky modifikována pro úpravu jejích fyzikálně-chemických vlastností. Těchto modifikací je celá řada. Často používanou úpravou je regenerace celulózy. Jedná se o chemický proces, při kterém se zvýší rozpustnost celulózy ve vodě. Regenerovaná celulóza se může dále zpracovávat a modifikovat. Produkt regenerace je označován jako viskóza. Mezi další modifikované celulózy patří acetát celulózy, oxidovaná celulóza, karboxymetylcelulóza, metylcelulóza, nitrát celulózy, hydroxyetylcelulóza nebo hydroxypropylcelulóza.

Nevýhoda celulózy a většiny jejích derivátů je její nedegradovatelnost v lidském těle. Oxidací celulózy na karboxycelulózu se změní její vlastnosti a stává se v těle degradovatelná, vstřebatelná a navíc má přirozené hemostatické účinky (Ohta et al., 2015). V klinické praxi se používá pro zástavu krvácení u operací nebo po nich (Velazquez-Avina et al., 2014). Je také hojně používána jako zábrana pooperačních srůstů (Park et al., 2013). Při plastické operaci

prsu po odstranění nádoru je dosahováno lepších estetických výsledků použitím oxidované celulózy jako výplně (Franceschini et al., 2015).

Karboxymethylcelulóza se připravuje karboxymetylací hydroxylových skupin na glukózových podjednotkách celulózy. Počet hydroxylových skupin substituovaných za karboxymetyl udává stupeň substituce (DS = degree of substitution). Neboť glukózové podjednotky disponují 3 hydroxylovými skupinami, maximální hodnota DS je 3. Rozpustnost karboxymethylcelulózy ve vodě umožňuje její použití ve formě hydrogelu pro léčbu degenerovaných meziobratlových plotének (Reza and Nicoll, 2010). Použití v plastické chirurgii u nasolabiálních záhybů, vrásek kolem úst nebo při zvětšování rtů dokonce dosahuje lepších výsledků než dosud používané silikonové implantáty (Leonardis et al., 2010).

Acetát celulózy obsahuje substituované hydroxylové skupiny za acetyl. V současné době není běžně v klinické praxi využíván, ale jeho potenciální aplikací se zabývá řada výzkumných týmů. Acetát celulózy úspěšně simuloval tkáň močového měchýře. Byla sestrojena matrice, která svoji architekturou simulovala mezibuněčnou hmotu močového měchýře a na ní byly s úspěchem kultivovány lidské endotelové buňky pupečnickové žíly (Han and Gouma, 2006). Také byl acetát celulózy použit pro výrobu mikrosenzoru, který zaznamenával koncentraci kyslíku v okolí Langerhansových ostrůvků. β -buňky sekretují inzulin v závislosti na metabolické aktivitě okolních buněk. Metabolická aktivita odpovídá množství naměřeného kyslíku (Jung et al., 1999). Acetát celulózy byl také použit jako 3D nosič pro kožní tkáňové inženýrství (Atila et al., 2015).

2.6.2 Poly- ϵ -kaprolakton

Syntetický polymer poly- ϵ -kaprolakton (PCL) se řadí mezi alifatické semikrystalické polyestery. Jeho fyzikální a mechanické vlastnosti závisí na molekulární hmotnosti a stupni krystalinity. Je nerozpustný ve vodě a alkoholech, ale rozpouští se v chloroformu, toluenu, benzenu, dichlormetanu a dalších. Jeho velkou předností je biodegradabilita a mísitelnost s ostatními polymery. Ze všech polyesterů vykazuje nejvíce hydrofobní charakter, což komplikuje jeho použití jako nosiče buněk. Ale smísením s dalšími polymery (např. hydroxyapatitem) lze smáčivost upravit do hodnot optimálních pro buněčnou adhezi (Abedalwafa et al., 2013). Rychlost degradace závisí na molekulární hmotnosti, stupni krystalinity a okolních podmínkách. Může trvat v řádu měsíců až let. Některé druhy bakterií umí PCL degradovat enzymaticky, ale v lidském těle dochází pouze ke spontánní degradaci hydrolýzou. Jeho příprava je možná dvěma způsoby. První možností je polymerace za otevření kruhu ϵ -kaprolaktonu, druhou metodou je polykondenzace 6-hydroxyhexanové kyseliny (Labet and Thielemans, 2009). PCL lze použít jako nosič léčivých látek

pro dlouhodobou aplikaci nebo jako nosič buněk v tkáňovém inženýrství kůže, kostí a cév (Abedalwafa et al., 2013; Bahrami et al., 2015; Pathak et al., 2015).

2.6.3 Kopolymer L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu

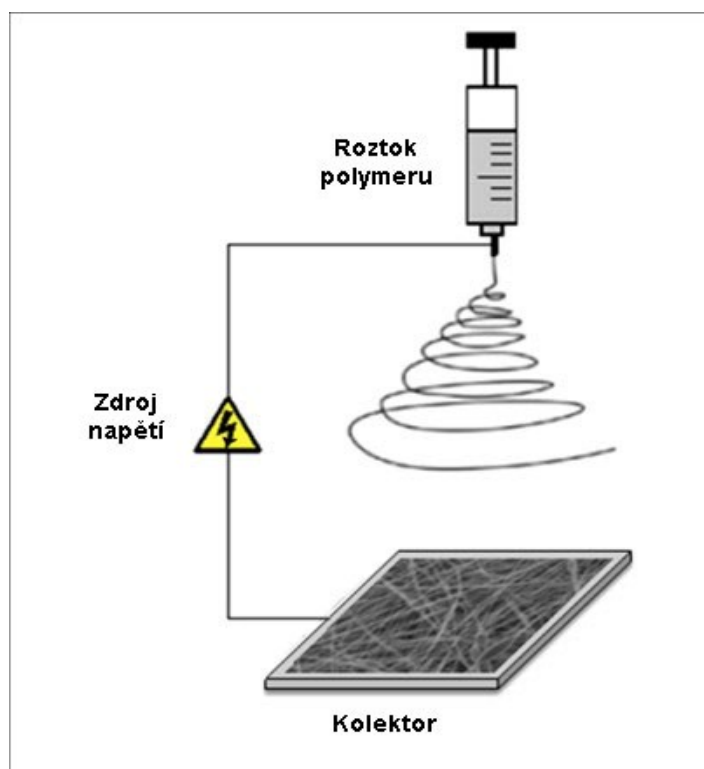
Kopolymer L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu spojuje vlastnosti těchto dvou polymerů. Poly-L-laktid je stejně jako výše zmíněný poly- ϵ -kaprolakton alifatický semikrystalický polyester. Ve vodě a alkoholech je nerozpustný, v chloroformu, dioxanu nebo acetonitrilu je rozpustný. Je biodegradabilní v rozmezí měsíců až let v závislosti na pórovitosti, chemickém složení a stupni krystalinity. Stejně jako poly- ϵ -kaprolakton je relativně hydrofobní, ale špatně mísitelný s ostatními polymery. Připravit se dá mnoha způsoby, z nichž nejběžnější je přímá polymerace a polymerace za otevření kruhu (Pretula et al., 2016). Uplatnění v medicíně nachází v podobě implantátů měkkých tkání (McCarty et al., 2013), chirurgického šicího materiálu (Lam et al., 1995), desek a šroubů pro fixaci kostí (Chang et al., 2015; Ueki et al., 2011), stentů (Nishio et al., 2012), systémů pro doručování léčivých látek (Immich et al., 2013) a materiálů pro tkáňové inženýrství (Shim et al., 2010).

Použití kopolymeru L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu není příliš běžné, ale byl testován jako nosič chondrocytů pro léčbu chrupavky (Jung et al., 2008) nebo jako nosič buněk obsahující léčivou látku pro využití v kostním tkáňovém inženýrství (Qiu et al., 2016).

2.6.4 Nanostrukturované materiály

Nanostrukturované materiály mohou být připraveny pomocí nanotechnologií. Nanotechnologie je odvětví zabývající se strukturami na úrovni 1 – 100 nm. Otcem myšlenky o manipulaci hmoty na úrovni atomů byl Richard Feynman. O 15 let později, roku 1974, byly pomocí nanotechnologií popsány procesy v polovodičích. Následoval objev fullerenu, kulovitých molekul složených z atomů uhlíku, které jsou umístěny do vrcholů pěti- a šestiúhelníků a uhlíkových nanotubic připomínající fullereny protažené do vlákna. Zájem o nanotechnologie velmi vzrostl a jeho spektrum využití je opravdu rozsáhlé od zemědělství a potravinářského průmyslu, přes textilní a stavební odvětví, po elektroniku, medicínské obory a kosmetiku (shrnutí v (Hulla et al., 2015)). Nanočástice stříbra jsou pro své antimikrobiální účinky přidávány do obalů na potraviny. Různé druhy nanočástic nacházejí uplatnění v detekci kvality potravin (Duncan, 2011). Nanovlákna přináší možnost nových vlastností pro textilie jako je vodoodpudivost, nemačkavost, mechanická odolnost, antibakteriální úprava, kontrola zápachu, UV ochrana a antistatické vlastnosti. Pokročilejší technologie pracují na textilu měnícím barvy, přenášejícím elektrické signály, uvolňujícím léčivé látky nebo kontrolujícím tělesné funkce (Yetisen et al., 2016). Nanočástice se v medicíně používají jako systémy dopravující léčivé látky, například pro selektivní likvidaci

nádorových buněk (Kato et al., 2012). Uhlíkové nanotrubičky, částice grafenu, uhlíkové tečky nebo fullereny zvyšují možnosti zobrazovacích metod (Wen et al., 2015). V tkáňovém inženýrství nanomateriály simulují architekturu tkáně a slouží jako nosiče buněk, například pro léčbu poranění kůže (Ranjbar-Mohammadi and Bahrami, 2015). Pro výrobu nanovláknenných membrán se od začátku 19. století používá technologie elektrostatického zvlákňování z jehly (Obr. 3).

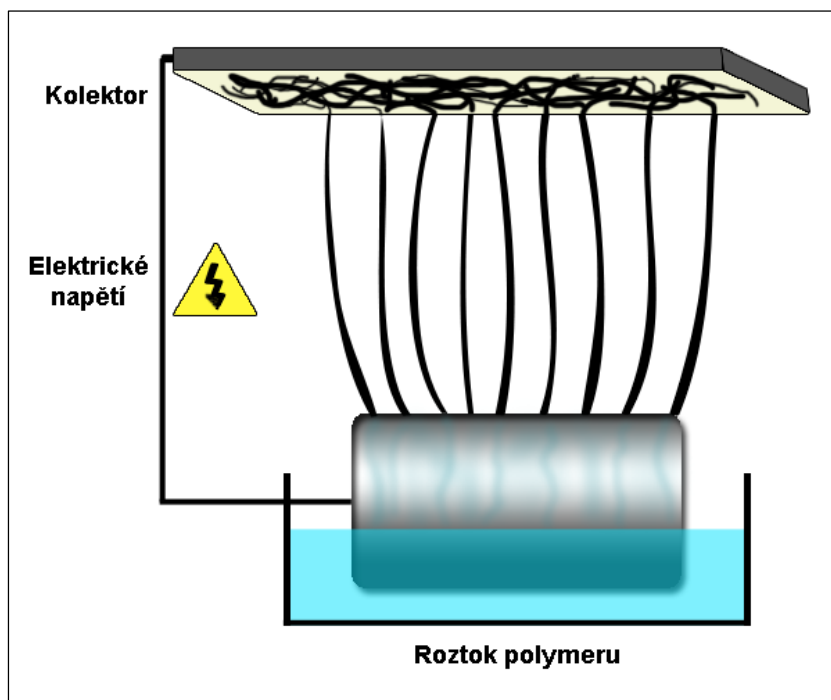


Obr. 3 Schéma výroby nanovláken metodou elektrostatického zvlákňování z jehly. Roztok polymeru je vytlačován z jehly a vlivem elektrického napětí se samouspořádává do vláken. Vlákeny jsou sbírány na kolektoru, kde vytváří síť. Převzato a upraveno z (Braghirolli et al., 2014).

Princip spočívá v tvorbě vláken z kapky roztoku pod vlivem elektrického napětí. Roztok polymeru je vytlačován z jehly, která je pod napětím. Kapka roztoku, která se na hrotu jehly vytvoří, je vlivem elektrického napětí přitahována směrem k elektricky nabitému kolektoru. Roztok polymeru se ze sférické kapky protahuje do tvaru tzv. Taylorova kuželu. Po překonání kapilárních sil, které působí mezi molekulami roztoku (dosažení kritické hodnoty) se z roztoku začnou tvořit vlákna, která na kolektoru vytváří síť (Braghirolli et al., 2014).

Bez jehlové elektrostatické zvlákňování představuje efektivnější metodu přípravy nanovláknenných matric. Tato technologie byla vynalezena na Technické univerzitě v Liberci

(TUL) pod názvem Nanospider™. Princip metody zůstává stejný jako u elektrostatického zvlákňování z jehly, ale místo jehly je použit válec, který je ponořen v roztoku polymeru (Obr. 4). Otáčením válce dochází k ulpívání roztoku na válci a pod elektrickým napětím dochází na několika místech k tvorbě vláken, které jsou opět sbírány na kolektor. Vzhledem k větší ploše, na které dochází k tvorbě vláken je tato metoda efektivnější (Dubský et al., 2012).



Obr. 4 Schéma výroby nanovláken metodou bez jehlového elektrostatického zvlákňování. K tvorbě vláken dochází na povrchu válce ponořeného v roztoku polymeru. Vlivem elektrického napětí jsou vlákna polymeru hnána na kolektor, kde dochází k tvorbě sítě.

Elektrostatické zvlákňování v ani jednom případě neumožňuje současné nanesení buněk, neboť při procesu zvlákňování dochází k jejich deformaci působícími silami. Metoda elektrospreje však na podobném principu jako elektrostatické zvlákňování vytváří mikrokapky, které mohou obsahovat buňky a rozstříkáváním kapek na kolektor dochází k jejich rovnoměrnému nanesení do celého 3D prostoru. Nemusí se již čekat, až buňky nosič osídlí v celém jeho prostoru, a doba přípravy takových náhrad je kratší (Yunmin et al., 2015).

Otázkou ale zůstává vliv používání nanotechnologií na lidské zdraví. Výzkum ohledně působení nanočástic na lidské tělo není jednoduchý, neboť se nacházíme v jiných rozměrech, ve kterých dosud nejsou vypracované protokoly na měření toxicity. Je potřeba vyvinout nové metody, které budou brát v potaz velikost, tvar a povrch částic a možnou interakci s buňkami a okolními molekulami. Tímto problémem se zabývá nové odvětví nanotoxikologie, které zjišťuje možné nepříznivé vlivy nanočástic na zdraví. Odvětví nanomedicíny studuje výhody

a rizika používaných nanomateriálů v oboru tkáňového inženýrství, zobrazovacích metod, biomateriálů nebo biosenzorů (shrnutí v (Hulla et al., 2015)). Z nejnovějších studií vyplývá, že použití nanočástic v těle vyvolává stresové reakce a produkci stresových látek (Periasamy et al., 2015).

3 Cíle práce

- Zhodnotit adhezi a proliferaci kožních buněk na různých typech materiálů určených pro kožní tkáňové inženýrství či přípravu krytů ran, a porovnat materiály mezi sebou.
- Potvrdit nebo vyloučit cytotoxicitu materiálů.
- Upravit chemické a fyzikální parametry materiálů proteinovými modifikacemi a tím podpořit adhezi a proliferaci buněk.
- Porovnat adhezi a proliferaci buněk na modifikovaných a nemodifikovaných materiálech.

4 Materiály

4.1 Použité materiály

- Celulóзовé materiály Hcel® NaT 1 – 7 (Holzbecher, spol. s r. o. barevna a bělidlo Zlích, Česká Skalice, Česká republika) sterilně balené v Tyvek®-PE fóliích (Wihuri spol. s r. o. Wipak, Nastola, Finsko)

Měřeno 28. 8. 2014	1	2	3	4	5	6	7
pH	9,03	7,45	7,65	7,65	7,20	6,90	7,30
Stupeň substituce	0,113	0,226	0,153	0,130	neměřeno	neměřeno	neměřeno
Síranový popel (hm. %)	3,68	7,60	5,28	3,64	neměřeno	neměřeno	neměřeno
Měřeno 1. 6. 2015	1	2	3	4	5	6	7
pH	8,60	7,37	7,40	7,35	7,05	7,07	7,18
Stupeň substituce	0,120	0,260	0,192	0,202	0,104	0,194	0,177
Síranový popel (hm. %)	3,48	7,57	5,31	4,21	2,39	4,53	3,50

Tab. 3 Popis materiálů Hcel® NaT 1 – 7. pH stanoveno z vodných výluhů. Stupeň substituce značí průměrný počet substituovaných hydroxylových skupin glukózových podjednotek za karboxymetylovou skupinu. Síranový popel udává množství (v hmotnostních %) přítomných kovů v materiálu.

- Nanovláknenná membrána z poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL, Mw = 45 000, Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA; Technická univerzita v Liberci)
- Nanovláknenná membrána z kopolymeru L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu (PLA/PCL, PURASORB® PLC 7015 kopolymer L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu v molárním poměru 70:30, Corbion Purac Biomaterials, Gorinchem, Nizozemsko; Technická univerzita v Liberci)
- Nanovláknenná membrána z acetátu celulózy (AC, Mw = 30 000, Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA; Nanopharma a. s., Pardubice, Česká republika)

4.2 Přístrojové vybavení

- Fluorescenční mikroskop Olympus IX 71 s digitální kamerou DP 70 (Olympus, Tokio, Japonsko) obj. 4x, 10x a 20x
- Fluidnatek LE-500 (Bionica, Valencia, Španělsko)

- Konfokální mikroskop Leica TCS SPE DM 2500 CSQ V-VIS (obj. 20x/0,70 IMM a obj. 40x/1.15, OIL)
- Nanospider NS 1WS500U (Elmarco spol. s r. o., Liberec, Česká republika)
- Orbitální třepačka SSL1 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, United Kingdom)
- Quanta 450 (Fei spol. s r. o., Hillsboro, Oregon, USA)
- Spektrofotometr VersaMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices spol. s r. o., Sunnyvale, Kalifornie, USA)
- Vi-CELL® XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter Life Sciences, Brea, California, USA)
- xCELLigence® (La Roche spol. s r. o., Basilej, Švýcarsko)

4.3 Chemikálie

- 25% vodný roztok amoniaku
- Deionizovaná sterilní voda
- 70% etanol
- Fosfátový pufr (PBS = phosphate-buffered saline)
- 0,02 M kyselina octová
- Tris-HCl (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, v destilované vodě)
- Antitrombin III (Chromogenix, Milán, Itálie)
- Fibrinogen z lidské plazmy (Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA)
- Potkaní kolagen typu I (BD Biosciences, San José, Kalifornie, USA)
- Trombin (Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA)
- Gentamicin (LEK a. s., Lublaň, Slovinsko)

- Fetální hovězí sérum (FBS = fetal bovine serum; Sebak spol. s r. o., Aidenbach, Německo)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) s fenolovou červení (Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA)
- Hovězí albumin (Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA)
- 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI; Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA)
- Hoechst #33258 (Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA)
- Phalloidin-tetrametylrhodamin (Phalloidin-TRITC) (Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA)
- Texas Red C₂-maleimid (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Tween (Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA)
- Primární monoklonální myší protilátka proti kolagenu typu I (Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA)
- Primární polyklonální králičí protilátka proti fibrinogenu (Dako Denmark a. s., Glostrup, Dánsko)
- Sekundární F(ab')₂ kozí IgG (H+L) protilátka proti myší primární protilátce konjugovaná s Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Sekundární F(ab')₂ kozí IgG (H+L) protilátka proti králičí primární protilátce konjugovaná s Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Metabolický test WST-1 (La Roche spol. s r. o., Basilej, Švýcarsko)

4.4 Buněčné typy

- Lidské keratinocyty linie HaCaT (CLS Cell Lines Service spol. s r. o., Eppelheim, Německo)
- Primární lidské kožní fibroblasty (Lonza Group spol. s r. o., Basilej, Švýcarsko)

4.5 Laboratorní nádobí

- Kultivační inserty CellCrown™ (Scaffdex spol. s r. o., Tampere, Finsko)
- Kultivační polystyrenové 24-jamkové destičky (TPP Techno Plastic Products a. s., Trasadingen, Švýcarsko)
- 96-jamková polystyrenová destička Nunc-Immuno™ MicroWell™ (Sigma-Aldrich Co. spol. s r. o., St. Louis, Missouri, USA)
- 96-jamková polystyrenová destička se zlatými mikroelektrodami pro xCELLigence® (E-Plate view; La Roche spol. s r. o., Basilej, Švýcarsko)

5 Metody

5.1 Výroba materiálů

5.1.1 Výroba materiálů Hcel[®] NaT

V rámci externí spolupráce s firmou Holzbecher, spol. s r. o. barevna a bělidlo Zlích, byly připraveny materiály ze sodné soli karboxymethylcelulózy ve formě hydrovláken, na trhu vedené pod názvem Hcel[®] NaT. Disociací sodíku ve vodném prostředí dochází ke gelovatění materiálů. Jedná se o vláknité netkané textilie připravené karboxymetylací vysoce čisté bavlny (PurCotton) zpracované technologií spunlace, převedené na formu sodné soli. Byly připraveny 4 různé typy materiálů (1 - 4) lišící se stupněm substituce karboxymetylové skupiny a hodnotami pH (Tab. 3). Neboť materiály 1, 3 a 4 vykazovaly vyšší hodnoty pH, než je přirozené pH v živém organismu, byly máčeny v roztoku 1 ml 100% kyseliny octové a 1,5 l 70% isopropylalkoholu (pH = 4,5) po dobu 20 minut. Následně byly materiály 15 minut vypírány v 70% roztoku isopropylalkoholu a dalších 15 minut v 100% roztoku isopropylalkoholu. Tyto materiály byly označeny čísly 5 - 7. Pro stanovení pH byl 1 g materiálu přelit 100 ml vařící vody. Po vychladnutí bylo měřeno pH výluhu. První měření neobsahuje údaje DS a síranového popela u vzorků 5 - 7 (Tab. 3). Proto bylo provedeno druhé měření, ale hodnoty pH a DS se od prvního měření liší, patrně díky samovolné degradaci materiálů. Všechny typy Hcel[®] NaT byly sterilizovány γ -zářením v dávce 25 kGy a následně sterilně zabaleny do Tyvek[®]-PE fólií.

5.1.2 Výroba nanovláknenných membrán

Nanovláknenné membrány z poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) a kopolymeru L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu (PLA/PCL) byly připraveny v rámci externí spolupráce s TUL. Polymery byly rozpuštěny v roztoku chloroformu, etanolu a kyseliny octové v poměru 8:1:1. Následně byly zpracovány metodou bezjehlového elektrostatického zvlákňování technologií Nanospider[™], kdy v roztoku polymeru byl ponořen otáčející se válec – kladná elektroda (35 kV) a nad ním ve vzdálenosti 15 cm byl kolektor - záporná elektroda (10 kV). Roztok, který ulpěl na válcí, byl při otočení válce hnán v podobě vláken elektrostatickými silami na kolektor, který měnil svoji polohu, a vytvořila se vláknenná vrstva. Podmínky, za kterých membrány vznikaly, byla teplota 21 °C a relativní vlhkost 65 %.

Nanovláknenné membrány z acetátu celulózy vyrobila firma Nanopharma a. s. v rámci externí spolupráce. Byla použita metoda elektrostatického zvlákňování z jehly. 12% roztok acetátu celulózy v acetonu a dimetylacetamidu v poměru 2:1 byl dávkovací pumpou vháněn do jehly – kladná elektroda (10 kV). Při vytlačení roztoku polymeru z jehly, se vlivem kapilárních sil

utvořila sférická kapka, která byla vlivem vysokého napětí protahována do tvaru Taylorova kuželu. Při dosažení tzv. kritické hodnoty, kdy působící elektrická síla byla větší než kapilární, začalo docházet k samoorganizaci roztoku do nanovláken. Ta byla elektrickým polem hnána na kolektor – záporná elektroda (-20 kV) a vznikla nanovláknenná vrstva. Kolektor byl od jehly vzdálen 13 cm. Nanovláknenná membrána vznikala za teploty 23 °C a relativní vlhkosti 5 %.

5.2 Hodnocení struktury materiálů a měření velikosti vláken

Struktura materiálů byla sledována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Snímky SEM nanovláknenných membrán byly připraveny v rámci externí spolupráce s TUL, respektive firmou Nanopharma a. s. SEM snímky materiálů Hcel® NaT byly připraveny na Ústavu struktury a mechaniky hornin AV ČR. Materiály byly pozlaceny v argonové atmosféře a snímány SEM mikroskopem Quanta 450 ve vysokém vakuu (10^{-4} Pa). K detekci docházelo v režimu sekundárních elektronů při urychlovacím napětí 30 kV pomocí Everhart-Tornleyova detektoru.

Průměr vláken byl měřen na SEM snímcích v programu Atlas (Tescan spol. s r. o., Brno, Česká republika).

5.3 Příprava vzorků

Materiály byly nastříhány na čtverečky o straně 1,5 cm a upevněny do kultivačních insertů CellCrown™ o průměru 1 cm (Obr. 5). Tyto inserty držely materiály u dna kultivační jamky, aby buňky po nasazení adherovaly na materiál. Celulózové materiály Hcel® NaT byly dodávány již sterilní. Pro zachování sterility byly smočeny v 70% etanolu. Nanovláknenné membrány byly sterilizovány v 70% etanolu po dobu 30 minut. Všechny vzorky byly následně proplachovány ve sterilní deionizované vodě po dobu 1 – 3 dnů, aby došlo k vymytí etanolu a zbytků rozpouštědel používaných při výrobě materiálů. Vzorky v insertech byly následně vloženy do kultivačních jamek 24-jamkové destičky (průměr jamky 1,5 cm).



Obr. 5 Kultivační inserty CellCrown™ o průměru 1 cm s upevněným materiálem.

5.4 Proteinové modifikace

5.4.1 Kolagenové vrstvy

Byly připraveny dva typy kolagenových vrstev lišící se postupem přípravy. První typ kolagenových vrstev vzniká při změně pH z kyselé do zásadité (protokol č. 1). Na vzorky byl nanesen roztok kolagenu I (o výsledné koncentraci 200 µg/ml) v 0,02 M kyselině octové a vysrážen v parách 25% vodného roztoku amoniaku po dobu 3 minut. Vzorky byly 2x opláchnuty sterilní vodou pro kultivační média a ponechány v ní přes noc při +4 °C. Druhý typ kolagenových vrstev vzniká v neutrálním prostředí (pH = 7,4, protokol č. 2). Vzorky byly inkubovány v roztoku kolagenu I (výsledné koncentrace 100 µg/ml) v PBS přes noc při +4 °C. Druhý den byly před nasazením buněk všechny vzorky 2x promyty v PBS. Množství nanášeného roztoku na 1 vzorek (0,4 ml) bylo zvoleno tak, aby byl materiál zcela ponořen.

5.4.2 Fibrinové vrstvy

Příprava fibrinových vrstev je založena na biologickém procesu hemokoagulace, kdy dochází kaskádou enzymatických reakcí k přeměně rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Fibrin vytváří síť zachytávající krevní destičky a tím brání úniku krve z poraněné cévy. Enzymem, který katalyzuje tuto reakci, je trombin.

I v případě fibrinových vrstev bylo užito dvou odlišných protokolů. Všechny vzorky byly 1 hodinu ponechány v roztoku fibrinogenu (výsledná koncentrace činila 10 µg/ml) v pufru Tris-HCl. Následně byly 2x opláchnuty Tris-HCl. Naadsorbovaný fibrinogen byl aktivován přidáním roztoku trombinu (konečná koncentrace 2,5 U/ml) v Tris-HCl na dobu 15 minut. V případě protokolu č. 1 byly vzorky 2x opláchnuty v Tris-HCl a při druhém oplachu nechány 20 minut ležet v Tris-HCl. U protokolu č. 2 nebyl vůbec oplach proveden. Tvorba fibrinové sítě byla dokončena přidáním roztoku fibrinogenu (o výsledné koncentraci 400 µg/ml) v Tris-HCl

a antitrombinu III (výsledná koncentrace 1U/ml) v destilované vodě v poměru 1:1. Katalytickou reakcí adsorbovaného trombinu s volným fibrinogenem v roztoku byla vytvořena fibrinová síť. Antitrombin blokoval působení nadbytečného trombinu, aby nedocházelo k formování 3D sítě, ale pouze tenké 2D vrstvy. Po 1 hodině byly vzorky 1x opláchnuty v Tris-HCl a 1x v PBS. Objem kapaliny (0,4 ml) na 1 vzorek byl takový, aby byl materiál plně ponořen.

5.5 Kultivace buněk na materiálech

Před nasazením buněk byly materiály znovu vysterylizovány 15 minut pod UV zářením. Vzorky byly osazeny lidskými keratinocyty linie HaCaT a primárními lidskými kožními fibroblasty. Oba typy buněk byly kultivovány v médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) s 10% fetálním hovězím sérem (FBS) a se 40 µg/ml gentamicinu. Do každé jamky 24-jamkové kultivační destičky se vzorkem bylo napipetováno 1,5 ml buněčné suspenze v kultivačním médiu. Na materiály Hcel® NaT bylo nasazeno 50 000 buněk na jamku kultivační destičky (tzn. cca 25 000 b/cm²). Na nanovláknenné membrány bylo nasazeno 30 000 buněk na jamku kultivační destičky (tzn. cca 15 000 b/cm²). Tento rozdíl byl dán odlišnou morfologií materiálů, kde póry mezi vlákny Hcel® NaT byly větší a buňky snáze propadávaly až na dno kultivační jamky. Počet buněk byl stanoven pomocí Vi-CELL® analyzery, který analyzuje obraz buněčné suspenze a určuje koncentraci, velikost, distribuci a viabilitu buněk barvením buněčné suspenze trypanovou modří. Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C, při 90% vzdušné vlhkosti a za 5% atmosférického tlaku CO₂.

5.6 Sledování morfologie proteinových modifikací na materiálech

Morfologie proteinových modifikací byla sledována imuno fluorescenčním barvením na čerstvě připravených vzorcích (den 0) a na vzorcích kultivovaných v DMEM bez buněk po dobu 7 dní za stejných podmínek použitých pro kultivaci buněk. Dále byla morfologie vrstev hodnocena na materiálech osazených buňkami 3. a 7. den kultivace. Jako kontrola pro ověření nespecifické vazby primární či sekundární protilátky byl použit nemodifikovaný materiál bez buněk a s buňkami.

Pro eliminaci nespecifické vazby primární nebo sekundární protilátky byl na vzorky nanesen 1% roztok hovězího albuminu v PBS. Po 20 minutách byl 2x proveden oplach PBS. Dále byly vzorky 20 minut ponechány v 1% roztoku Tweenu v PBS. Opět byly 2x opláchnuty v PBS.

Na vzorky s kolagenovou vrstvou byl dán roztok primární monoklonální myší protilátky proti kolagenu typu I (ředěné 200x v PBS). Na vzorky s fibrinovou vrstvou byl nanesen roztok primární polyklonální králičí protilátky proti fibrinogenu (ředěné 200x v PBS). Vzorky byly máčeny v primární protilátce přes noc při +4 °C.

Druhý den byl 2x proveden oplach v PBS a na vzorky byl nanesen roztok sekundární F(ab')₂ kozí IgG (H+L) protilátky (ředěné 400x v PBS) proti myší primární protilátce v případě kolagenových vrstev a proti králičí primární protilátce v případě fibrinových vrstev, konjugované s Alexa Fluor® 488. Sekundární protilátka byla na vzorcích ponechána 1 hodinu za nepřístupu světla. Před focením byly vzorky 2x opláchnuty v PBS. Objem nanášeného roztoku na 1 vzorek byl 0,4 ml, kdy byl vzorek plně ponořen. Vzorky byly skenovány na konfokálním fluorescenčním mikroskopu Leica TCS SPE (obj. 20x/0,70 IMM a obj. 40x/1.15 OIL).

5.7 Hodnocení adheze, morfologie a proliferace buněk na materiálech

K hodnocení adheze a růstu kožních buněk na materiálech nemodifikovaných a modifikovaných proteinovými vrstvami bylo využito fluorescenční mikroskopie. Hodnocení probíhalo 1., 3. a 7. den po nasazení buněk a jako kontrola sloužilo polystyrenové dno kultivační jamky uzpůsobené pro optimální adhezi buněk.

Po opláchnutí vzorků v PBS byla provedena fixace buněk 70% etanolem, vychlazeným na teplotu -20 °C po dobu 10 minut. Po fixaci byly vzorky opět opláchnuty v PBS. Následně byl na vzorky nanesen roztok fluorescenčních barviv v PBS. Použitým fluorescenčním barvivem byl červeně emitující Phalloidin konjugovaný s tetrametylrhodaminem (Phalloidin-TRITC, výsledná koncentrace 5 µg/ml), vážící se na F-aktin, který tvoří cytoskelet buněk. Dalším červeným barvivem byl Texas Red C₂-maleimid (konečná koncentrace 100 ng/ml), který se váže na volnou thiolovou skupinu přítomnou u proteinů v cytoplazmě, tudíž pomáhá detekovat cytoplazmu buněk. Jádra buněk jsme vizualizovali modře pomocí 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, o výsledné koncentraci 1 µg/ml) nebo Hoechst #33258 (výsledná koncentrace 5 µg/ml), jež se váží do malého žlábků DNA v A-T bohaté oblasti. Barvení ve všech případech probíhalo 1 hodinu za nepřístupu světla. Po uplynutí doby barvení byly vzorky opláchnuty v PBS. Vzorky byly foceny na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX 71 s digitální kamerou DP 70 při zvětšení obj. 4x, 10x a 20x nebo na konfokálním mikroskopu Leica TCS SPE (obj. 20x/0,70 IMM).

5.8 Měření metabolické aktivity buněk

Metabolická aktivita buněk odpovídající jejich proliferaci byla stanovena pomocí metabolického testu WST-1. Princip metody spočívá v redukci tetrazoliové soli WST-1 na barevný produkt formazan. Za přeměnu látky je zodpovědný mitochondriální enzym sukcinát-tetrazolium reduktáza, který je aktivní pouze u živých a metabolicky aktivních buněk. Množství přítomného formazanu bylo zjištěno spektrofotometricky při vlnové délce 440 nm.

Měření bylo provedeno ze tří nezávislých vzorků pro každou experimentální skupinu a časový interval (1., 3. a 7. den po nasazení). Jako kontrola bylo zvoleno polystyrenové dno kultivační jamky. Pro odečet pozadí byly použity materiály bez buněk.

Vzorky byly opláchnuty v PBS a vloženy do čistých jamek kultivační destičky pro zamezení vlivu buněk adherovaných na dně kultivační jamky. Na vzorky byl nanesen 1 ml roztoku WST-1, 11x ředěného v kultivačním médiu DMEM bez obsahu fenolové červeně. Vzorky byly následně inkubovány v termostatu při 37 °C, při 90% vzdušné vlhkosti a za 5% atmosférického tlaku CO₂. Po zabarvení kultivačního média bylo z každé kultivační jamky pipetováno 3 x 100 µl kultivačního média do 96-jamkové destičky, ve které probíhalo samotné měření absorbance. K měření byl použit spektrofotometr ELISA Reader. Výsledné hodnoty byly zpracovány do grafu jako hodnoty absorbance ± výběrová směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost byla hodnocena pomocí software SigmaStat (Jandel Corporation spol. s r. o., Bredford, Velká Británie), metodou ANOVA, statistickým testem Student-Newman-Keuls, kdy hodnoty naměřené absorbance byly statisticky významné oproti ostatním, pokud splňovaly hodnotu parametru $p \leq 0,05$.

5.9 Testování materiálů na cytotoxicitu

Cytotoxicita materiálů byla hodnocena zařízením xCELLigence®. Princip měření spočívá v zaznamenávání změn impedance na pozlacených dnech jamek kultivační 96-jamkové destičky. Při nárůstu proliferace (počtu) buněk, hodnota impedance roste. Hodnoty impedance v závislosti na čase přístroj vynáší do grafu jako buněčný index (Cell Index).

Nejprve byly připraveny výluhy z materiálů. Tři vzorky od každé experimentální skupiny vložené do 24-jamkové destičky byly louhovány v kultivačním médiu DMEM bez přidaného FBS za standardních kultivačních podmínek (37 °C, 90% vzdušná vlhkost, 5% CO₂) a

neustálého proudění kapaliny v jamce mícháním na třepače (45 otáček/min) po dobu jednoho týdne.

Do každé jamky 96-jamkové destičky bylo napipetováno 180 μ l výluhu s 10% FBS a 10 μ l buněčné suspenze v DMEM s počtem 3000 buněk. Kultivační destička byla ihned vložena do měřicího přístroje připraveného v termostatu. Než stihly buňky adherovat na dno kultivační destičky, bylo měřeno pozadí výluhů po dobu 39 sekund s mezičasem měření 5 sekund, pro určení výchozích hodnot měření impedance. Následně bylo spuštěno samotné měření aktuální proliferace buněk opakovaným měřením impedance s mezičasem měření 30 minut. Celé měření probíhalo 7-10 dní. Jako kontrola sloužil výluh polystyrenové kultivační jamky a čerstvé kultivační médium. Proliferace buněk v daných časových intervalech byla vyjádřena jako buněčný index s odečtenou hodnotou pozadí \pm výběrová směrodatná odchylka (SD). K odečítání pozadí v jednotlivých časech byly použity výluhy bez buněk.

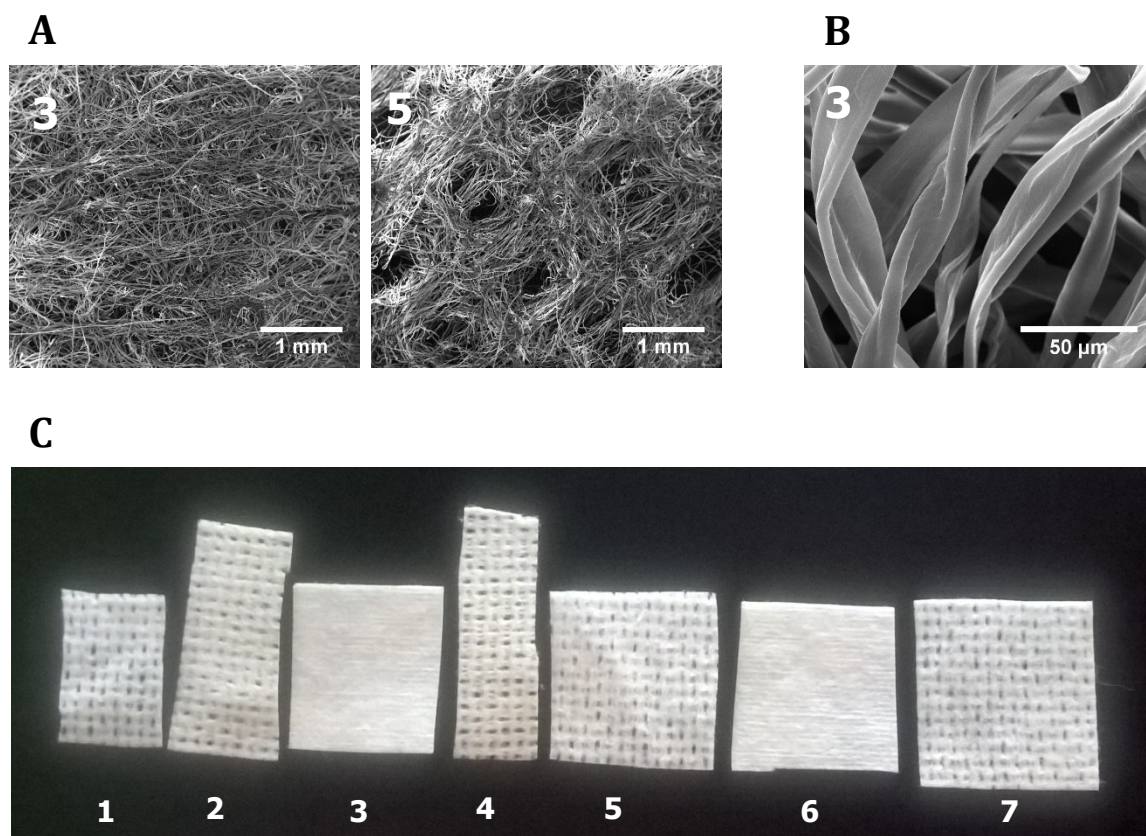
Po dokončení měření bylo provedeno hodnocení morfologie a počtu buněk fluorescenční mikroskopií.

Kromě testování cytotoxicity v přístroji xCELLigence® byly na vyluhované materiály nasazeny buňky a byla porovnávána jejich adheze, morfologie a proliferace s neluhovanými vzorky.

6 Výsledky

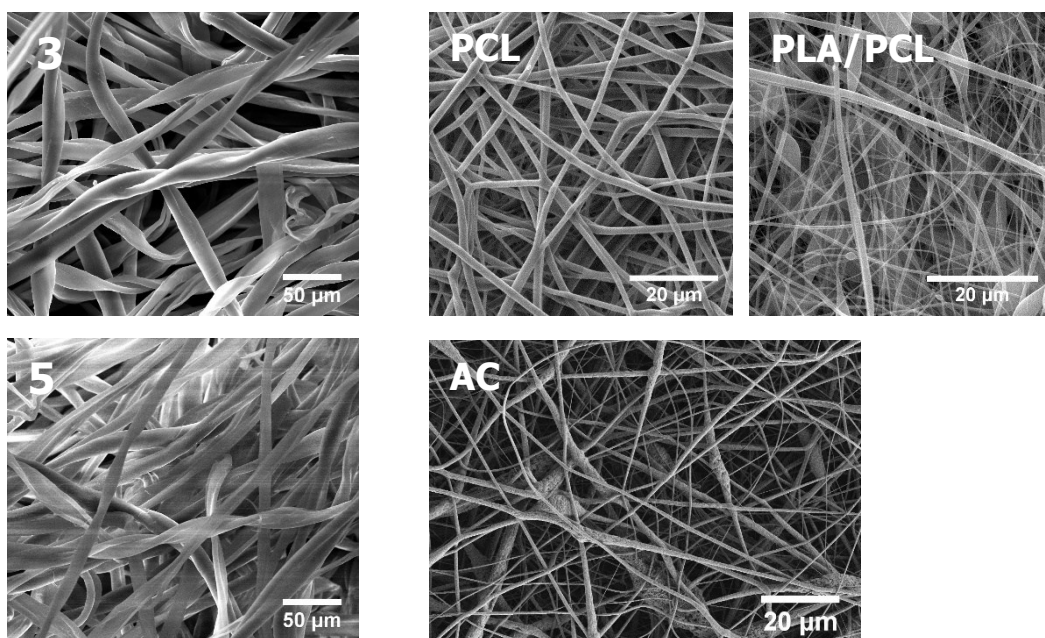
6.1 Struktura materiálů

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) byla pozorována struktura materiálů a jejich vláken a na snímcích byla měřena přibližná velikost průměru vláken. U materiálů Hcel® NaT byly pozorovány dvě odlišné formy struktury. Jedna forma struktury materiálů měla neorientovaná vlákna rovnoměrně rozvrstvená v celé ploše. Tuto strukturu vykazovaly materiály Hcel® NaT typu 3 a 6 (Obr. 6). Druhá forma struktury obsahovala paralelně jdoucí vlákna orientovaná do kříže kolem pórů, vzhledem připomínající tkaninu. Tato struktura se nacházela u typů 1, 2, 4, 5 a 7 (Obr. 6). Při zvětšení 2000x bylo možné pozorovat strukturu jednotlivých vláken celulózy ve tvaru pásků se zploštělým středem, které se stáčí do závitů. Tento tvar vlákna je pro bavlnu charakteristický (Obr. 6).



Obr. 6 A: SEM snímky zobrazující 2 formy struktury materiálů Hcel® NaT uvedené na příkladech materiálů typu 3 a 5. První forma se vyznačovala neuspořádanými vlákny v celé ploše, zatímco druhá forma měla vlákna uspořádaná kolem pórů v křížených pásech. **B:** Detailní SEM snímek celulóзовých vláken materiálů Hcel® NaT typu 3 vykazující charakteristický tvar bavlněných vláken ve tvaru závitů se zploštělým středem. **C:** Vzhled 7 typů materiálů Hcel® NaT, zleva typ 1 – 7. **A:**, **B:** Mikroskop Quanta 450, Everhart-Tornleyův detektor, zvětš. 70x, měřítko **A:** 1 mm, **B:** 50 μm.

Ze SEM snímků byl patrný rozdíl mezi materiály Hcel® NaT a nanovláknennými membránami z hlediska velikosti průměru vláken a pórů mezi nimi (Obr. 7). Zatímco průměr vláken materiálů Hcel® NaT se nacházel v řádu desítek mikrometrů, jak už název napovídá, nanovláknna měla průměr vláken v řádech nanometrů s horní hranicí v mikrometrech. Velikost pórů mezi vlákny se u materiálů Hcel® NaT nacházela v řádu tisíců mikrometrů čtverečných. U nanovláknenných membrán byly póry mezi vlákny značně menší, v rozmezí jednotek, maximálně desítek mikrometrů čtverečných. U nanovláknenných membrán bylo naměřeno široké rozpětí hodnot průměrů vláken naznačující nehomogenost vláken. Rozsah velikosti pórů byl široký u všech materiálů. Tento rozsah byl způsobený polohou vláken, kdy spodní vlákna mohla zmenšit původní velikost póru utvořeného vrchními vlákny (Tab. 4).



Obr. 7 SEM snímky zobrazující velikost a strukturu vláken a pórů mezi vlákny u materiálů Hcel® NaT, uvedené na příkladech typu 3 a 5 a na nanovláknenných membránách z PCL, PLA/PCL a AC. Mikroskop Quanta 450 Everhart-Tornleyův detektor, zvětš. 1000x, měřítko 50 μm. PCL zvětš. 3000x, měřítko 20 μm. PLA/PCL zvětš. 5000x, měřítko 20 μm. AC zvětš. 1000x, měřítko 20 μm.

Materiál	Průměrná hodnota průměru vláken ± SD	Rozpětí hodnot průměru vláken
Hcel® NaT 3	14,1 μm ± 4,0 μm	5,8 μm – 24,4 μm
Hcel® NaT 5	14,0 μm ± 4,7 μm	5,3 μm – 26,9 μm
PCL	1282,5 nm ± 645,7 nm	269,1 nm – 2989,2 nm
PLA/PCL	612,9 nm ± 329 nm	107,5 nm – 1838,7 nm
AC	538,3 nm ± 446,8 nm	67,2 nm – 2036,2 nm
	Průměrná hodnota velikosti pórů mezi vlákny ± SD	Rozpětí hodnot velikosti pórů mezi vlákny
Hcel® NaT 3	1325,7 μm ² ± 1938,5 μm ²	85,8 μm ² – 8732,3 μm ²
Hcel® NaT 5	1005,9 μm ² ± 1005,7 μm ²	104,3 μm ² – 3390,4 μm ²
PCL	19,8 μm ² ± 21,5 μm ²	1,4 μm ² – 121,3 μm ²
PLA/PCL	4,2 μm ² ± 5,9 μm ²	0,2 μm ² – 28,2 μm ²
AC	1,6 μm ² ± 2,2 μm ²	0,3 μm ² – 11,2 μm ²

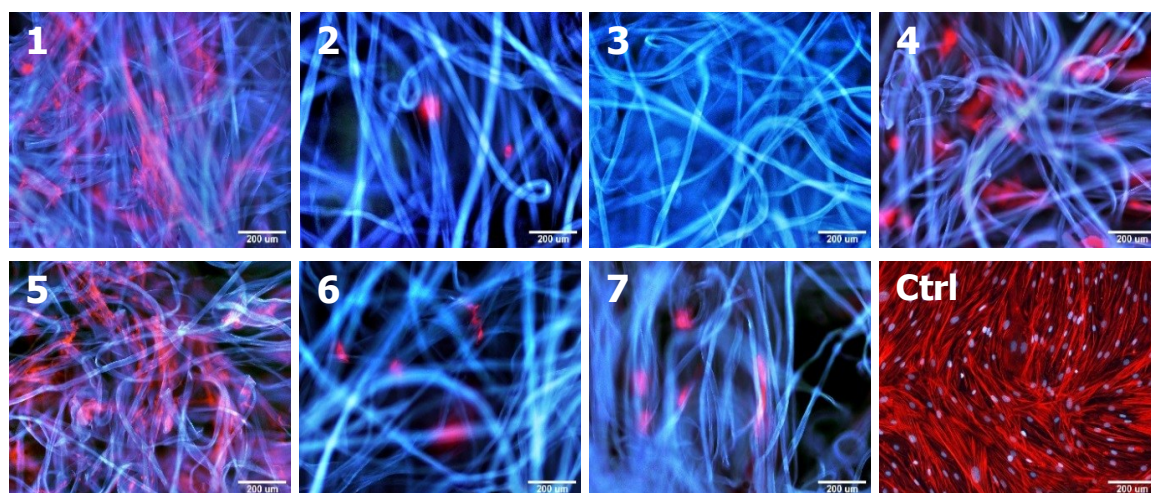
Tab. 4 Průměrná velikost průměru vláken materiálů, pórů mezi vlákny a rozpětí těchto naměřených hodnot.

6.2 Adheze, morfologie, proliferace a metabolická aktivita buněk na materiálech

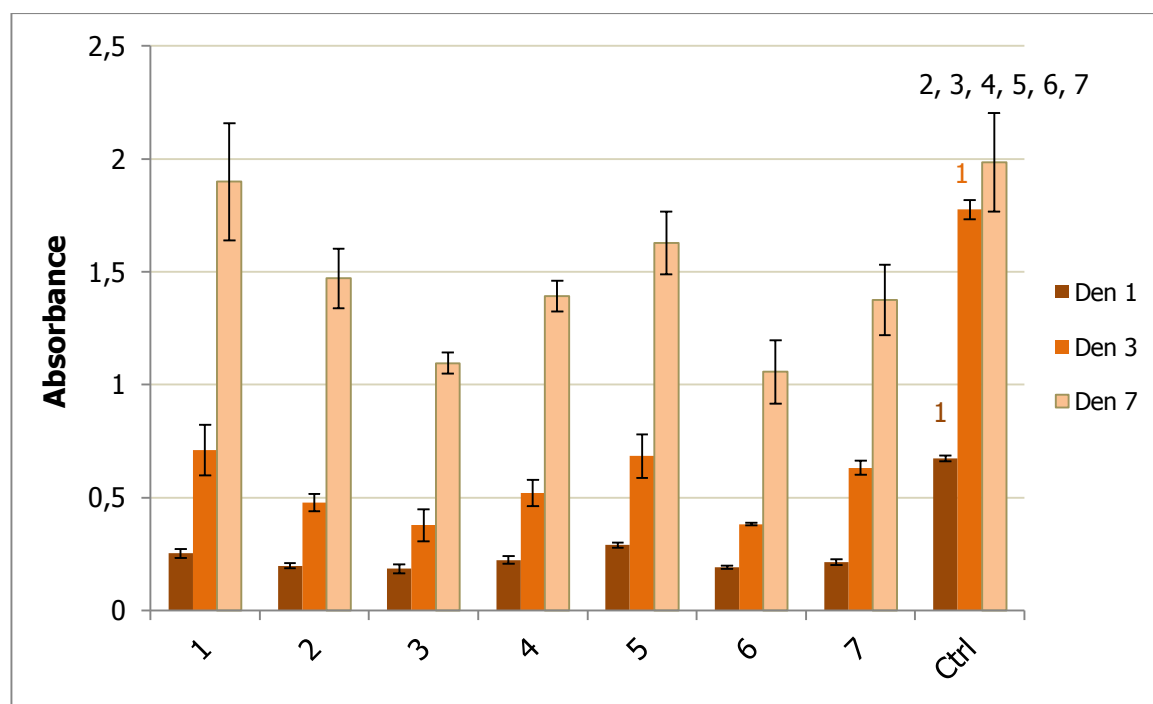
6.2.1 Materiály Hcel® NaT

Na 7 typech celulózových materiálů Hcel® NaT byly kultivovány primární lidské kožní fibroblasty. 1. den po nasazení buněk byly porovnávány jejich vlastnosti pro adhezi buněk na materiál. 3. a 7. den po nasazení bylo sledováno, zda materiály nepůsobí na buňky toxicky a zda vyhovují buňkám pro následný růst a dělení. Pozorování probíhalo pomocí fluorescenční mikroskopie a metabolického testu WST-1.

Mezi vzorky byly viditelné rozdíly v metabolické aktivitě buněk, která odpovídá jejich počtu, již první den po nasazení. Rozdíly v buněčném růstu se s rostoucím časovým intervalem umocňovaly (Graf 1). Na některých vzorcích buňky nebyly schopné adherovat, což lze pozorovat jako zakulacený buněčný tvar (Obr. 8 – typ 2, 3, 6). Také jejich počet byl nižší, než na vzorcích, kde buňky vykazovaly protáhlou morfologii (Obr. 8). Oproti polystyrenovému dnu kultivační jamky, které sloužilo jako kontrolní materiál, však žádný z materiálů nedosahoval srovnatelných hodnot (Graf 1).



Obr. 8 Adheze, morfologie a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů 7. den po nasazení na materiály Hcel® NaT (typ 1 – 7) a na kontrolní kultivační polystyrenovou jamku (Ctrl). Barveno kombinací fluorescenčních barviv Phalloidin-TRITC (aktin - červená) a Hoechst #33258 (jádra - modrá). Mikroskop Olympus IX 71 s digitální kamerou DP 70, obj. 10x, měřítko = 200 µm.

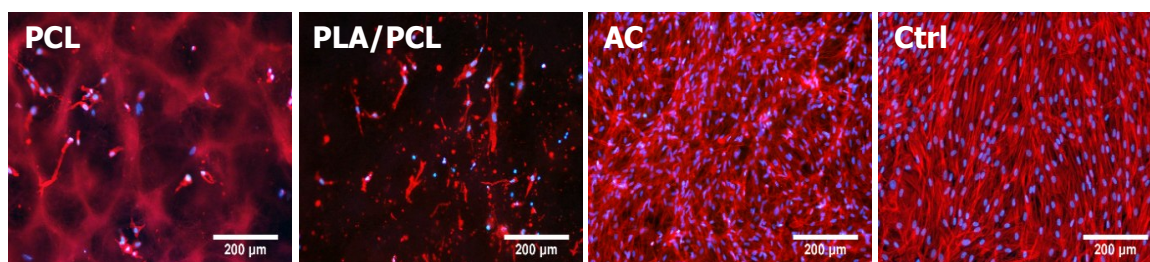


Graf 1 Metabolická aktivita primárních lidských kožních fibroblastů 1., 3. a 7. den po nasazení na Hcel® NaT (typ 1 – 7) a na kontrolní kultivační polystyrenovou jamku (Ctrl). Měřeno testem WST-1 při absorbanci 440 nm. Průměr \pm SD z 9 měření pro 3 nezávislé vzorky od každé experimentální skupiny a časového intervalu. Metoda ANOVA, statistický test Student-Newman-Keuls. Statistická významnost pro hodnotu parametru $p \leq 0,05$: nad sloupce v grafu se skupinou odpovídajícího značení, černě pro všechny tři časové intervaly, pro konkrétní časový interval v barvě časového intervalu.

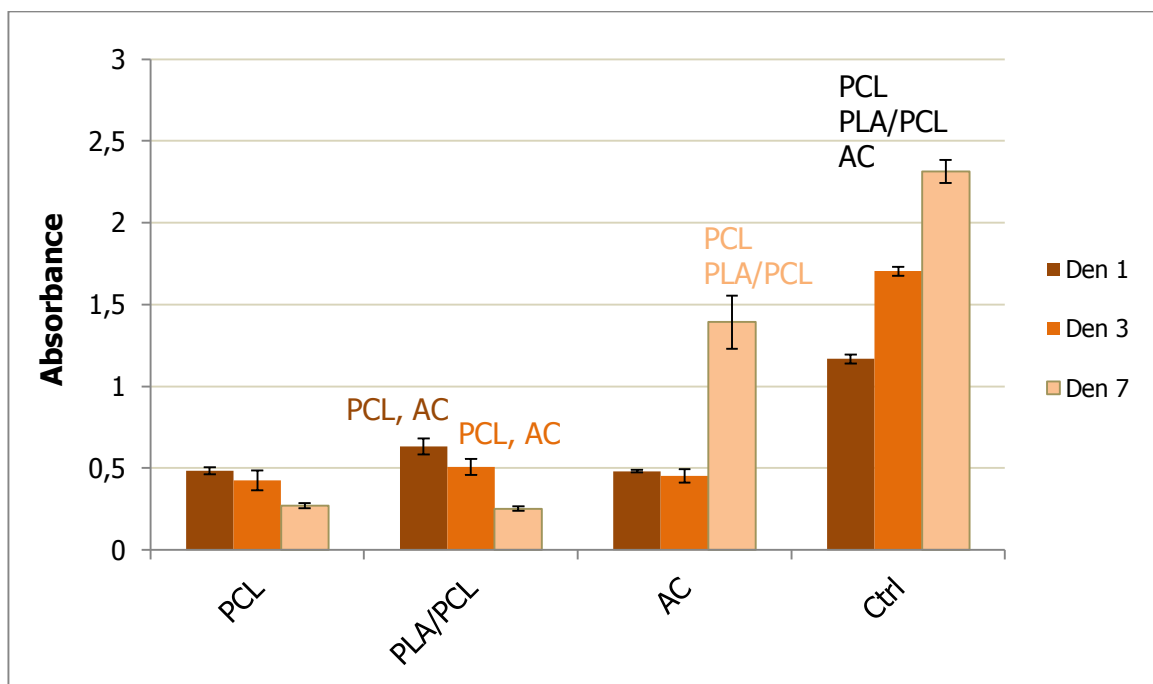
6.2.2 Nanovláknenné membrány

Na membránách z poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL), z kopolymeru L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu (PLA/PCL) a z acetátu celulózy (AC) byl pozorován růst a adheze primárních lidských kožních fibroblastů a lidských kožních keratinocytů linie HaCaT stejnými metodami a ve stejných časových intervalech jako v případě celulóзовých materiálů Hcel® NaT.

Jak se u membrán z PCL a PLA/PCL předpokládalo, skloubení vlastností PLA a PCL poskytuje buňkám vhodnější prostředí než pouze samotný PCL. Počet fibroblastů v průběhu kultivace na obou materiálech klesal (Graf 2). 7. den kultivace jejich morfologie neodpovídala přirozenému stavu vitálních buněk (Obr. 9). Na membráně z acetátu celulózy (AC) se buňkám 1. a 3. den kultivace dařilo srovnatelně s PCL a PLA/PCL (Graf 2). Mezi 3. a 7. dnem počet buněk skokově narostl a 7. den buňky dosáhly konfluence (Obr. 9).

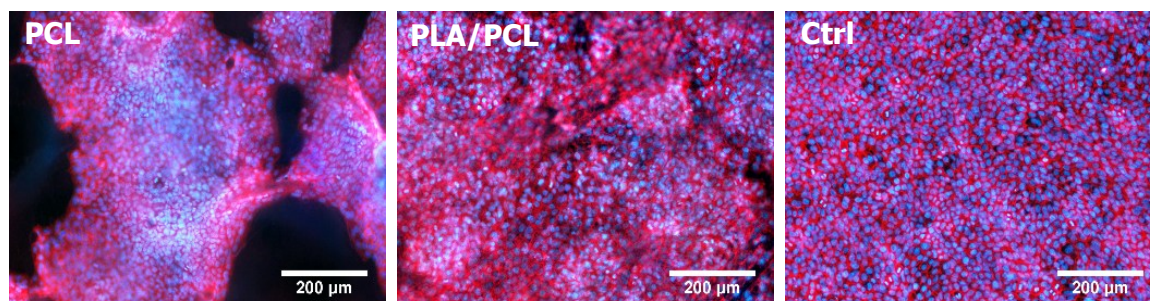


Obr. 9 Adheze, morfologie a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů 7. den po nasazení na PCL, PLA/PCL, AC a na kontrolní kultivační polystyrenovou jamku (Ctrl). Barveno kombinací fluorescenčních barviv Phalloidin-TRITC (aktin - červená) a DAPI (jádra - modrá). Mikroskop Olympus IX 71 s digitální kamerou DP 70, obj. 10x, měřítko = 200 μm .

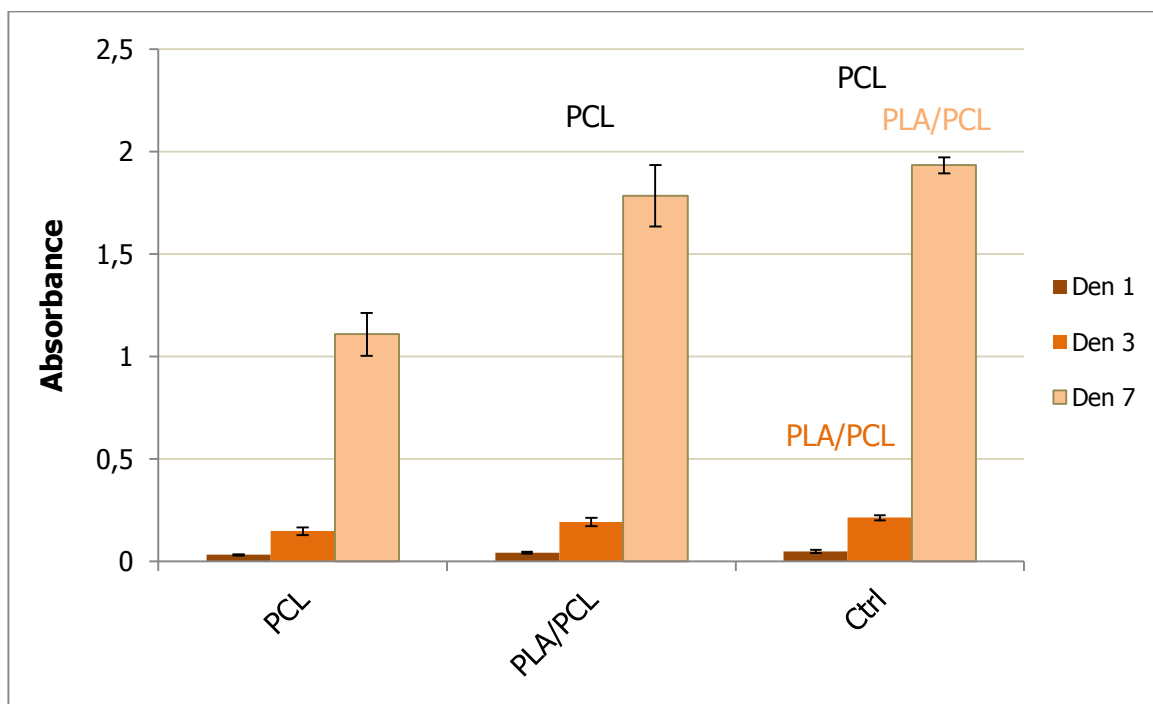


Graf 2 Metabolická aktivita primárních lidských kožních fibroblastů 1., 3. a 7. den po nasazení na PCL, PLA/PCL, AC a na kontrolní kultivační polystyrenovou jamku (Ctrl). Měřeno testem WST-1 při absorbanci 440 nm. Průměr \pm SD z 9 měření pro 3 nezávislé vzorky od každé experimentální skupiny a časového intervalu. Metoda ANOVA, statistický test Student-Newman-Keuls, statistická významnost pro hodnotu parametru $p \leq 0,05$; nad sloupci v grafu se skupinou odpovídajícího značení, černě pro všechny tři časové intervaly, pro konkrétní časový interval v barvě časového intervalu.

Na membránách z PCL a PLA/PCL byly následně kultivovány keratinocyty linie HaCaT, které jsou jakožto linie životaschopnější a tolerantnější vůči nepříznivým podmínkám prostředí. Ve srovnání s fibroblasty byla proliferace keratinocytů na všech typech materiálů vyšší a počet buněk se úměrně zvyšoval s dobou kultivace. 7. den kultivace byly keratinocyty na membráně z PLA/PCL konfluentní (Obr. 10, Graf 3).



Obr. 10 Adheze, morfologie a proliferace lidských keratinocytů linie HaCaT 7. den po nasazení na PCL, PLA/PCL a na kontrolní kultivační polystyrenovou jamku (Ctrl). Barveno kombinací fluorescenčních barviv Phalloidin-TRITC (aktin - červená) a DAPI (jádra - modrá). Mikroskop Olympus IX 71 s digitální kamerou DP 70, obj. 10x, měřítko = 200 μ m.



Graf 3 Metabolická aktivita lidských keratinocytů linie HaCaT 1., 3. a 7. den po nasazení na PCL, PLA/PCL a na kontrolní kultivační polystyrenovou jamku (Ctrl). Měřeno testem WST-1 při absorbanci 440 nm. Průměr \pm SD z 9 měření pro 3 nezávislé vzorky od každé experimentální skupiny a časového intervalu. Metoda ANOVA, statistický test Student-Newman-Keuls, statistická významnost pro hodnotu parametru $p \leq 0,05$: nad sloupci v grafu se skupinou odpovídajícího značení, černě pro všechny tři časové intervaly, pro konkrétní časový interval v barvě časového intervalu.

6.3 Hodnocení cytotoxicity materiálů

Protože růst buněk na některých materiálech nebyl uspokojivý, bylo třeba zjistit, jestli materiály na buňky nepůsobí cytotoxicky nebo pouze nemají vhodné vlastnosti pro adhezi a proliferaci buněk. Z materiálů byly připraveny týdenní výluhy do kultivačního média a v nich byly kultivovány keratinocyty linie HaCaT a primární lidské kožní fibroblasty. Jejich proliferace byla měřena metodou xCELLigence® a jako kontrola bylo použito kultivační médium týden inkubované v polystyrenové kultivační jamce (PS) a čerstvé kultivační médium (DMEM).

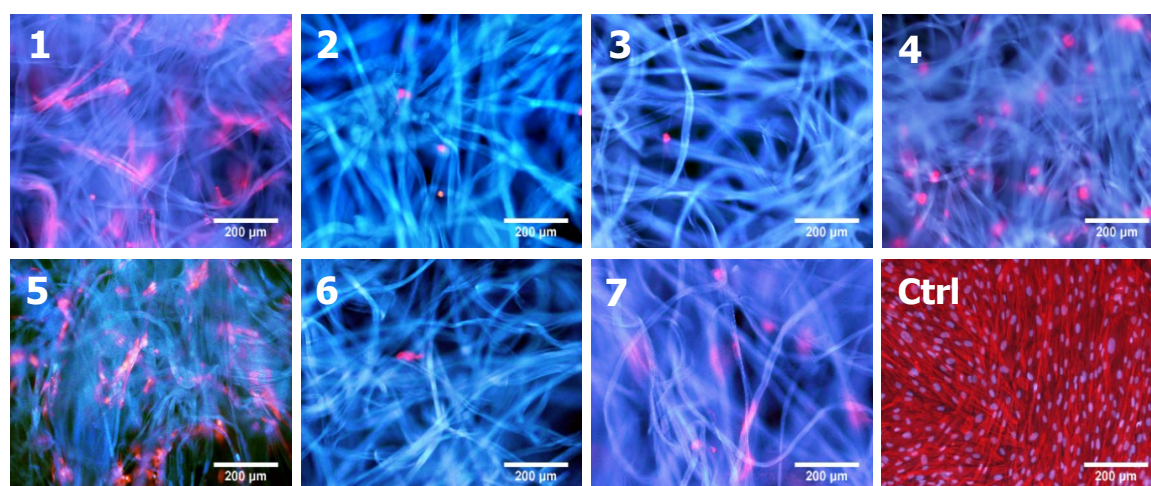
Ani u jednoho typu materiálu nebyla zaznamenána křivka ukazující na jeho cytotoxicitu. U materiálů Hcel® NaT dosahovala linie keratinocytů HaCaT průměrných hodnot buněčného indexu 6 s rozsahem hodnot od 2 do 10. Fibroblasty dosahovaly hodnot menších (3,5 – 4,5), ale rozdíly mezi hodnotami jednotlivých typů Hcel® NaT byly malé a všechny typy vykazovaly růstovou křivku ve vyšších hodnotách než obě kontroly. Bylo s podivem, že vzorek typu 3, který nepodporoval adhezi a následnou proliferaci kožních fibroblastů, vykazoval nejlepší růstovou křivku ze všech materiálů pro oba buněčné typy. Naopak typ 1, který lépe

podporoval adhezi a růst buněk, vykazoval nízkou růstovou aktivitu buněk v jeho výluhu (Přílohy - Graf 7).

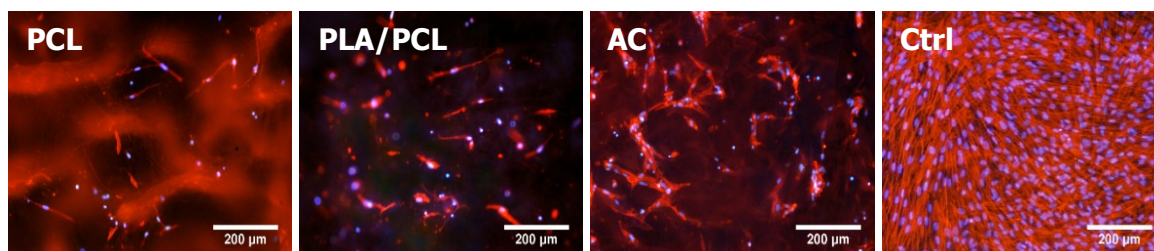
U výluhů z nanovláknenných membrán dosáhla linie HaCaT vyšších hodnot buněčného indexu (mezi 9,5 - 13), než tomu bylo u materiálů Hcel® NaT. Buněčný index fibroblastů se pohyboval mezi hodnotami 2 a 3. U obou buněčných typů měly růstovou křivku s nejvyššími hodnotami materiály AC a PCL. Avšak všechny tři nanovláknenné membrány dosahovaly vyšších hodnot než obě kontroly (Přílohy - Graf 7).

Po ukončení měření buněčné proliferace byla hodnocena morfologie buněk fluorescenční mikroskopií (Přílohy - Obr. 19). Oba typy buněk vykazovaly ve všech výluzích morfologii vitálních buněk, shodnou s kontrolními materiály. Dna kultivačních jamek byla rovnoměrně osídlena buňkami a jejich hustota byla srovnatelná s kontrolními materiály. Testované materiály nevykazovaly tudíž cytotoxicitu.

Zároveň byly na materiály týden louhované v kultivačním médiu nasazeny kožní fibroblasty a bylo fluorescenční mikroskopií sledováno, zda případně došlo k vyloučení škodlivých látek do média a zlepšení proliferace buněk. Výsledky byly porovnávány s nelouhovanými materiály (Obr. 8, Obr. 9). Sledování probíhalo opět 1., 3. a 7. den kultivace buněk. Žádné patrné zlepšení nebylo pozorováno, naopak u nanovláknenných materiálů došlo ke zhoršení, které je nejvíce zřetelné u acetátu celulózy (Obr. 11, Obr. 12).



Obr. 11 Adheze, morfologie a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů 7. den po nasazení na materiály Hcel® NaT týden louhované v kultivačním médiu a na kontrolní polystyrenovou kultivační jamku (Ctrl). Porovnáváno s nelouhovanými materiály (**Obr. 8**). Barveno kombinací fluorescenčních barviv Phalloidin-TRITC (aktin - červená) a DAPI (jádra - modrá). Mikroskop Olympus IX 71 s digitální kamerou DP 70, obj. 10x, měřítko = 200 µm.



Obr. 12 Adheze, morfologie a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů 7. den po nasazení na nanovláknenné membrány z PCL, PLA/PCL a AC týden louhované v kultivačním médiu a na kontrolní polystyrenovou kultivační jamku (Ctrl). Porovnáváno s nelouhovanými materiály (**Obr. 9**). Barveno kombinací fluorescenčních barviv Phalloidin-TRITC (aktin - červená) a DAPI (jádra - modrá). Mikroskop Olympus IX 71 s digitální kamerou DP 70, obj. 10x, měřítko = 200 μm.

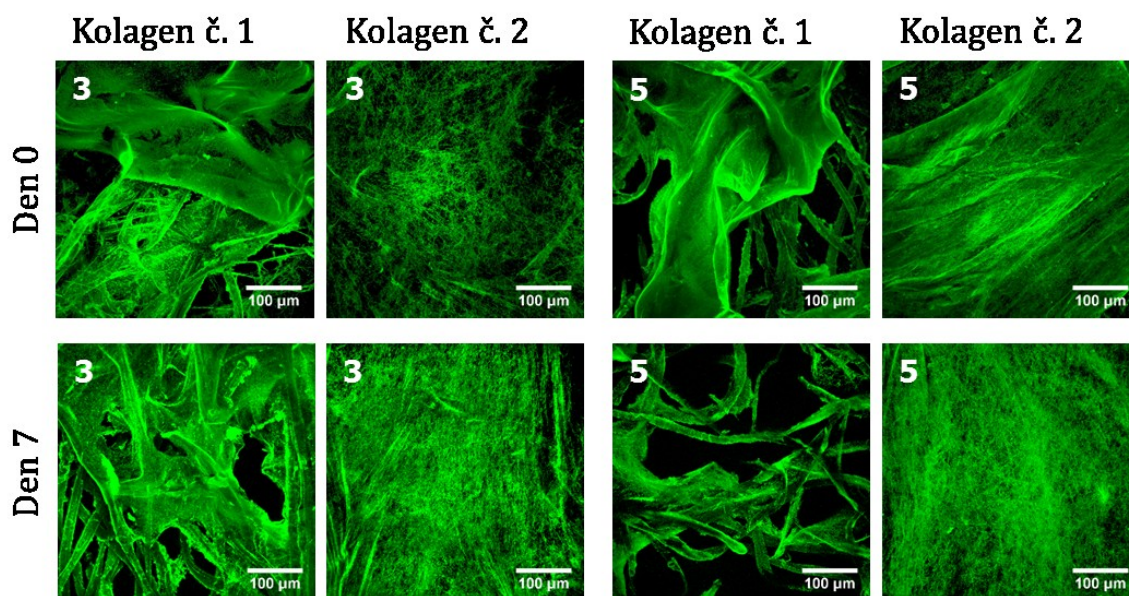
6.4 Úprava vlastností materiálů

Vzhledem k tomu, že u žádného ze vzorků se nepotvrdilo vylučování toxických látek, byla špatná proliferace buněk považována jako důvod nevyhovujících vlastností materiálů. Tyto vlastnosti lze zlepšit proteinovou modifikací. Mikrostruktura materiálů Hcel® NaT příliš nepodporovala adhezi buněk a jejich vzájemnou komunikaci. Relativně velké póry v řádu tisíců mikrometrů čtverečných mezi jednotlivými vlákny bránily rozprostření buněk a buňky byly nuceny se orientovat vždy ve směru vlákna. Nebylo tudíž možné dosáhnout konfluentní vrstvy buněk na vzorku. Cílem modifikace bylo vytvořit jemnou nanostrukturu na povrchu materiálu, která obalí vlákna a vyplní póry mezi vlákny. Je známo, že nanostruktura lépe simuluje přirozenou strukturu ECM. Dochází tak k adsorpci adhezivních molekul v konformaci dobře přístupné adhezním receptorům buněk a zlepšuje tím kolonizaci materiálu buňkami (shrnuje v (Bacakova et al., 2011; Sun et al., 2012)). Ze všech typů Hcel® NaT byly vybráni dva zástupci. Materiál č. 5, neboť vykazoval nejlepší vlastnosti pro proliferaci a byla snaha tyto vlastnosti ještě zlepšit a vzorek č. 3, který svými vlastnostmi patřil k nejhorším, ale přitom při testování cytotoxicity působil nejméně toxicky.

6.4.1 Struktura a stabilita kolagenových vrstev na Hcel® NaT

Vrstvy z kolagenu typu I byly zhotoveny podle dvou odlišných protokolů. Struktura kolagenových vrstev byla vzápětí po přípravě vizualizována metodou imunofluorescence a pozorována konfokálním mikroskopem. Protokol č. 1 dal vzniknout struktuře podobné gelu, která ovšem nebyla homogenně vytvořena po celé ploše vzorku. Zároveň kolagen rovnoměrně pokryl jednotlivá vlákna materiálu. Protokol č. 2 vytvářel jemnou vláknitou síť homogenně distribuovanou po celé ploše vzorku (Obr. 13). Protože bylo potřeba zjistit, zda je tato modifikace stabilní v čase a nedegraduje spontánně bez působení buněk, byly vrstvy po 7 dní inkubovány v kultivačním médiu, za stejných podmínek použitých pro kultivaci

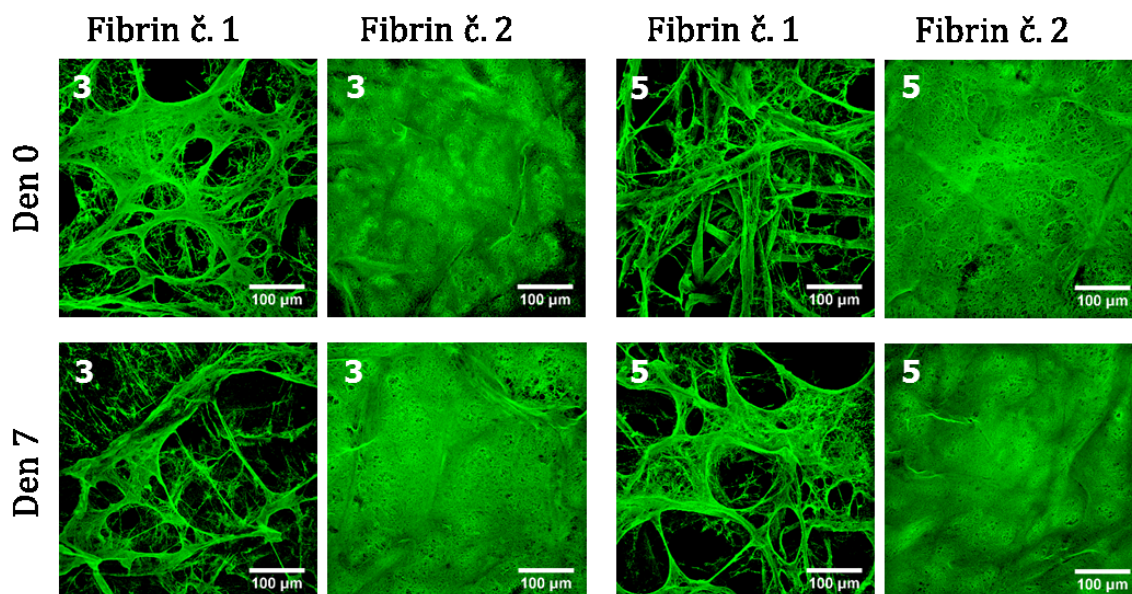
buněk, a následně vizualizovány (Obr. 13). K degradaci a změně struktury obou typů kolagenových vrstev nedocházelo. Nicméně vláknitá síť kolagenu (protokol č. 2) byla náchylná ke strhnutí vlivem manipulace.



Obr. 13 Struktura kolagenových vrstev připravených podle protokolu č. 1 a č. 2 na materiálech Hcel® NaT (typ 3 a 5). Čerstvě připravené vrstvy (den 0) a vrstvy inkubované v médiu DMEM (37 °C, 5% CO₂) po dobu 7 dní. Barveno primární protilátkou (myší proti kolagenu I) a sekundární protilátkou (Alexa Fluor® 488). Konfokální mikroskop Leica TCS SPE DM 2500, obj. 20x/0,70 OIL, měřítko = 100 μm.

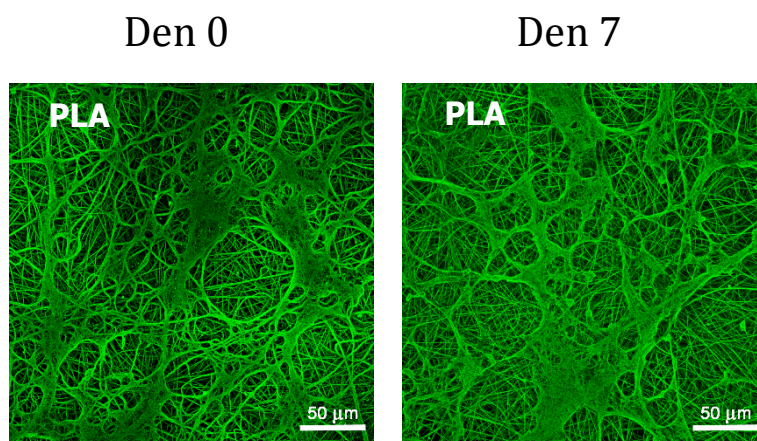
6.4.2 Struktura a stabilita fibrinových vrstev na Hcel® NaT a na nanovláknenných membránách

Fibrinové vrstvy byly rovněž připraveny dvěma odlišnými postupy, kdy jeden slouží především k podpoře proliferace buněk (protokol č. 1) a druhý k úpravě strukturních vlastností Hcel® NaT (protokol č. 2). Ihned po přípravě a po 7 dnech kultivace v médiu byla opět pomocí imunofluorescenčního barvení pozorována konfokálním mikroskopem jejich vzniklá struktura a stabilita v čase. Při přípravě vrstev podle protokolu č. 1 fibrin obaloval především vlákna celulózy a místy vytvářel síť s většími póry. Při přípravě podle protokolu č. 2 vznikala jemná síťka rovnoměrně ležící po celé ploše vzorku. Obě tyto struktury byly po dobu 7 dnů inkubace v kultivačním médiu stabilní a jejich morfologie se neměnila (Obr. 14).



Obr. 14 Struktura fibrinových vrstev připravených podle protokolu č. 1 a č. 2 na materiálech Hcel® NaT (typ 3 a 5). Čerstvě připravené vrstvy (den 0) a vrstvy inkubované v médiu DMEM (37 °C, 5% CO₂) po dobu 7 dní. Barveno primární protilátkou (králičí proti fibrinogenu) a sekundární protilátkou (Alexa Fluor® 488). Konfokální mikroskop Leica TCS SPE DM 2500, obj. 20x/0,70 OIL, měřítko = 100 μm.

Nanovláknenné membrány byly modifikovány fibrinovými vrstvami pouze podle protokolu č. 1, neboť struktura vláken membrán již sama o sobě vytváří jemnou síť. Struktura fibrinových vrstev na nanovláknenných membránách byla ukázána již v předchozích studiích (Bacakova et al., 2016a) a je podobná jako u materiálů Hcel® NaT. Fibrin obaloval vlákna a místy vytvářel jemnou síť. I zde jsme prokázali, že vrstva byla v čase 7 dnů stabilní. (Obr. 15)

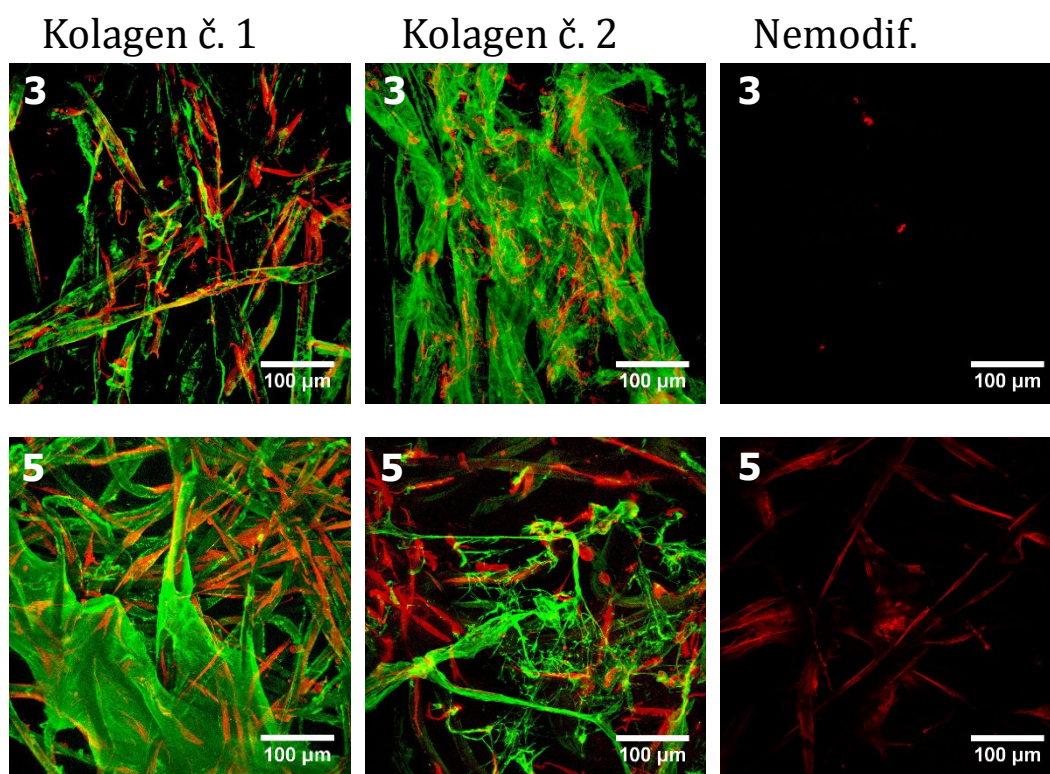


Obr. 15 Struktura fibrinových vrstev připravených podle protokolu č. 1 na nanovláknenné membráně z poly-L-laktidu (PLA). Čerstvě připravená vrstva (den 0) a vrstva inkubovaná v médiu DMEM (37 °C, 5% CO₂) po dobu 7 dní. Barveno primární protilátkou (králičí proti fibrinogenu) a sekundární protilátkou (Alexa Fluor® 488). Konfokální mikroskop Leica TCS SPE DM 2500, obj. 40x/1,15 OIL, měřítko = 50 μm. Převzato z (Bacakova et al., 2016a).

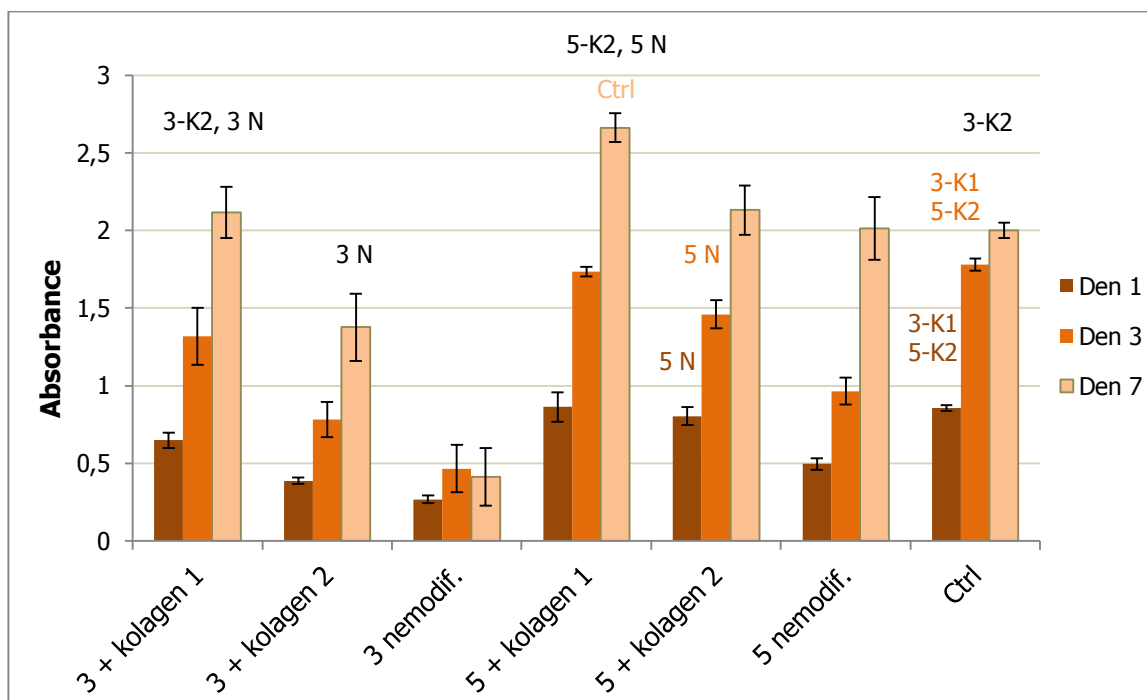
6.4.3 Adheze, morfologie a proliferace buněk na modifikovaných celulózových materiálech Hcel® NaT

Na modifikovaných materiálech byly kultivovány primární lidské kožní fibroblasty v časových intervalech 1, 3 a 7 dní. Adheze a proliferace buněk byly porovnávány s nemodifikovanými vzorky pomocí fluorescenční mikroskopie a metabolického testu WST-1.

Ve srovnání s nemodifikovanými vzorky rostly kožní buňky na obou kolagenových modifikacích lépe, zejména na vrstvách připravených protokolem č. 1. U materiálu typu č. 3 byl rozdíl mezi modifikovanými a nemodifikovanými vzorky větší. K velké změně došlo hlavně v morfologii buněk, která odpovídá přirozenému protáhlému tvaru fibroblastů (Graf 4, Obr. 16).



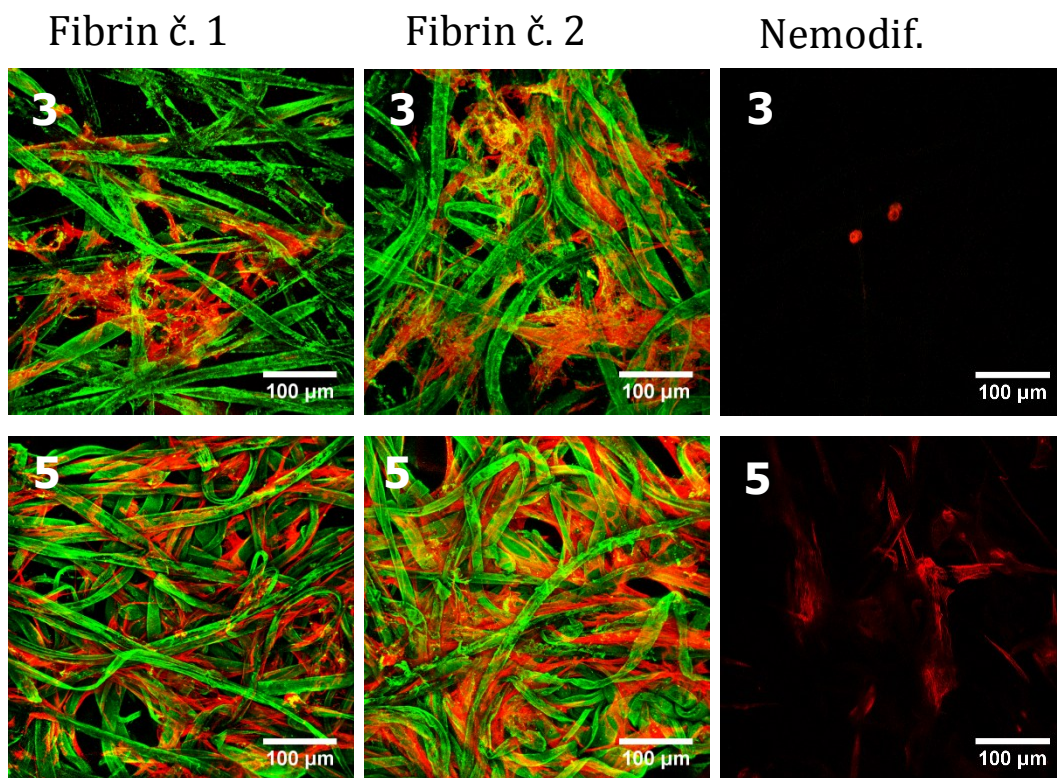
Obr. 16 Adheze, morfologie a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů 3. den po nasazení na materiály Hcel® NaT (typ 3 a 5) modifikované kolagenem podle protokolu č. 1 a č. 2. a na nemodifikované materiály. Kolagen barven primární protilátkou (myší proti kolagenu I) a sekundární protilátkou (Alexa Fluor® 488). F-aktin buněk barven Phalloidin-TRITC (červená). Konfokální mikroskop Leica TCS SPE DM 2500, obj. 20x/0,70 OIL, měřítko = 100 μm.



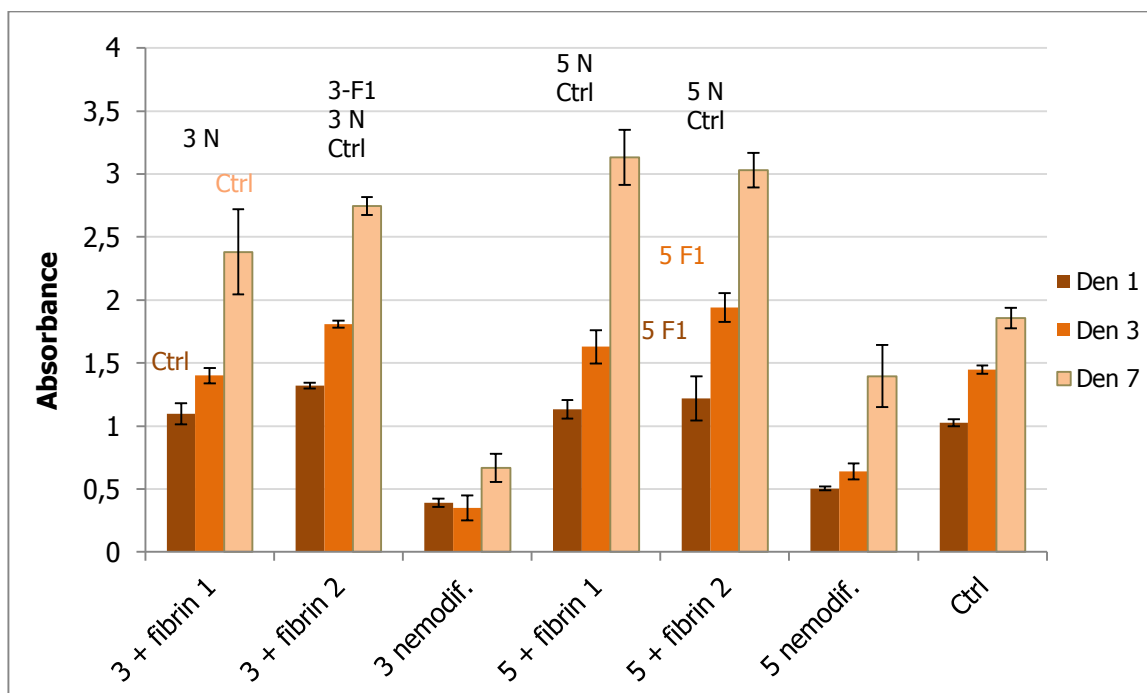
Graf 4 Metabolická aktivita primárních lidských kožních fibroblastů 1., 3. a 7. den po nasazení na Hcel® NaT (typu 3 a 5) modifikované kolagenem podle protokolu č. 1 a č. 2, na nemodifikované vzorky a na kontrolní kultivační polystyrenovou jamku (Ctrl). Měřeno testem WST-1 při absorbanci 440 nm. Průměr \pm SD z 9 měření pro 3 nezávislé vzorky od každé experimentální skupiny a časového intervalu. Metoda ANOVA, statistický test Student-Newman-Keuls, statistická významnost pro hodnotu parametru $p \leq 0,05$: nad sloupci v grafu se skupinou odpovídajícího značení, černě pro všechny tři časové intervaly, pro konkrétní časový interval v barvě časového intervalu.

V případě fibrinových vrstev, oba typy přispěly k lepší adhezi a proliferaci buněk ve srovnání s nemodifikovanými vzorky. Nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi oběma typy. Oba postupy dosáhly znatelného zvýšení počtu buněk, který je velmi vyrovnaný (Graf 5). Avšak zejména z hlediska adheze buněk se zdá vláknitá fibrinová síť (protokol č. 2) výhodnější. Opět u materiálu č. 3 je pozorovatelný výraznější rozdíl vůči nemodifikovanému kontrolnímu materiálu, především v morfologii buněk. Na materiálech typu č. 5 dosáhly buňky 7. den konfluency (Obr. 17).

Kolagenové i fibrinové vrstvy, v obou případech, ale zejména vrstvy vytvářející jemnou vláknitou síť (protokoly č. 2), byly buňkami postupně degradovány. Avšak ještě po týdnu kultivace byly na vzorcích patrné oblasti s fibrinem i kolagenem (data nejsou uvedena).



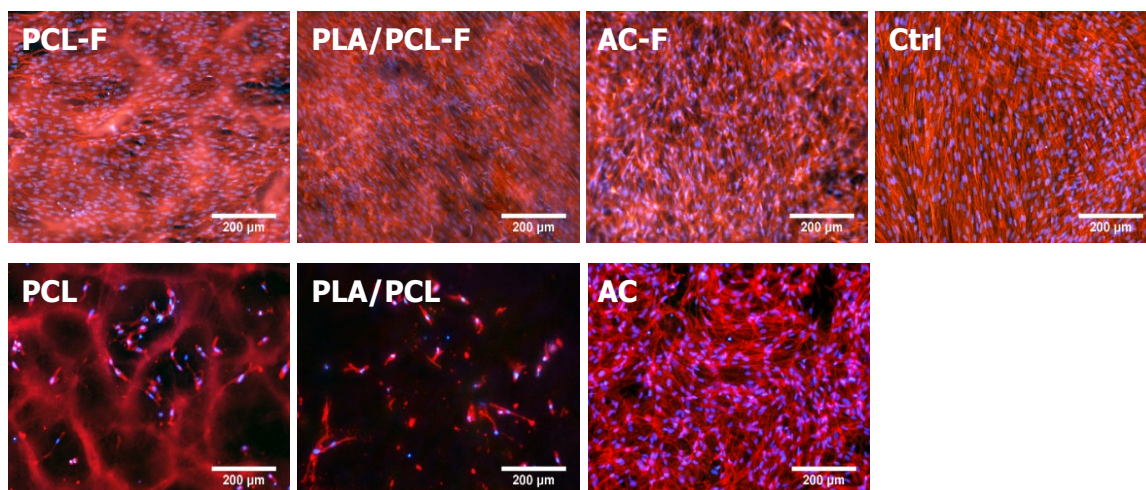
Obr. 17 Adheze, morfologie a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů 3. den po nasazení na materiály Hcel® NaT (typ 3 a 5) modifikované fibrinem podle protokolu č. 1 a č. 2. a na nemodifikované materiály. Fibrin barven primární protilátkou (králičí proti fibrinogenu) a sekundární protilátkou (Alexa Fluor® 488). F-aktin buněk barven Phalloidin-TRITC (červená). Konfokální mikroskop Leica TCS SPE DM 2500, obj. 20x/0,70 OIL, měřítko = 100 μm.



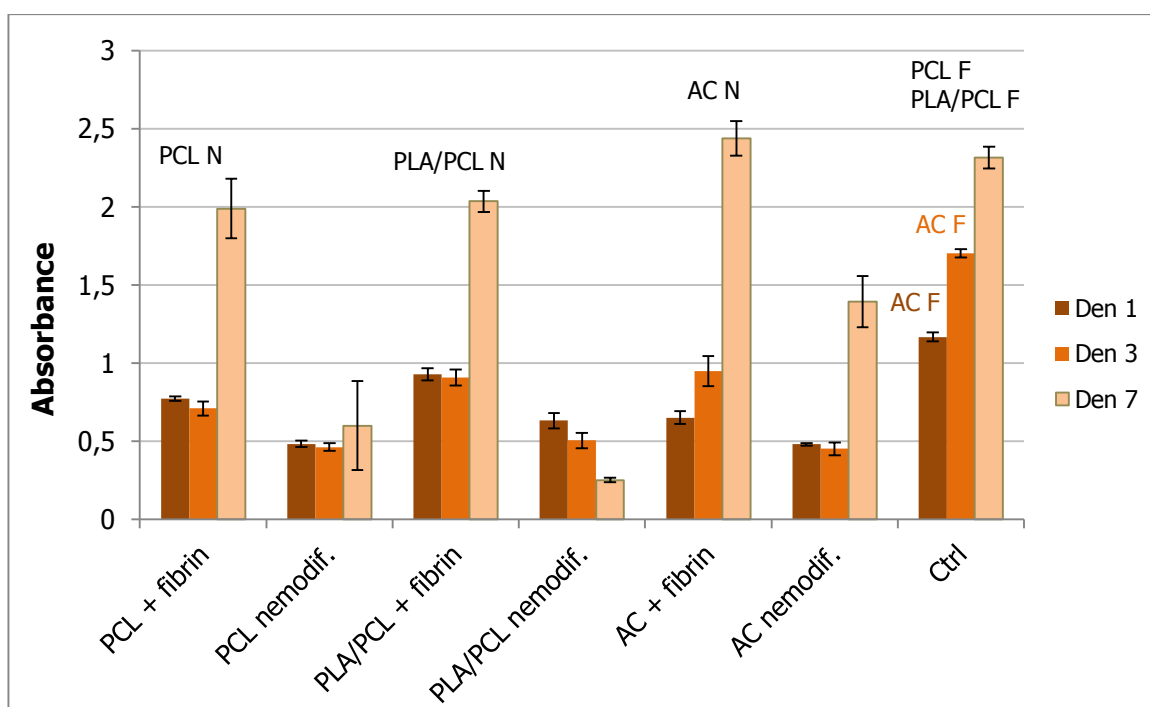
Graf 5 Metabolická aktivita primárních lidských kožních fibroblastů 1., 3. a 7. den po nasazení na Hcel® NaT (typu 3 a 5) modifikované fibrinem podle protokolu č. 1 a č. 2, na nemodifikované vzorky a na kultivační polystyrenovou jamku (Ctrl). Měřeno testem WST-1 při absorbanzi 440 nm. Průměr \pm SD z 9 měření pro 3 nezávislé vzorky od každé experimentální skupiny a časového intervalu. Metoda ANOVA, statistický test Student-Newman-Keuls, statistická významnost pro hodnotu parametru $p \leq 0,05$: nad sloupci v grafu se skupinou odpovídajícího značení, černě pro všechny tři časové intervaly, pro konkrétní časový interval v barvě časového intervalu.

6.4.4 Modifikace nanovláknenných membrán

Na nanovláknenných membránách modifikovaných fibrinem podle protokolu č. 1 byla sledována adheze a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů v čase 1., 3. a 7. den kultivace. Hodnoty byly pomocí fluorescenční mikroskopie a metabolického testu WST-1 porovnávány s nemodifikovanými membránami. I u těchto materiálů došlo po modifikaci fibrinem k výrazné podpoře proliferačních schopností buněk a 7. den po nasazení buněk byly membrány konfluentně porostlé. (Obr. 18, Graf 6).



Obr. 18 Adheze, morfologie a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů 7. den po nasazení na nanovláknenné membrány z PCL, PLA/PCL a AC modifikované fibrinem podle protokolu č. 1 (-F), na nemodifikované materiály a na kontrolní polystyrenovou kultivační jamku (Ctrl). Barveno kombinací fluorescenčních barviv Phalloidin-TRITC (aktin - červená) a DAPI (jádra - modrá). Mikroskop Olympus IX 71 s digitální kamerou DP 70, obj. 10x, měřítko = 200 µm.



Graf 6 Metabolická aktivita primárních lidských kožních fibroblastů 1., 3. a 7. den po nasazení na PCL, PLA/PCL a AC modifikované fibrinem podle protokolu č. 1, na nemodifikované vzorky a na kultivační polystyrenovou jamku (Ctrl). Měřeno testem WST-1 při absorbanci 440 nm. Průměr \pm SD z 9 měření pro 3 nezávislé vzorky od každé experimentální skupiny a časového intervalu. Metoda ANOVA, statistický test Student-Newman-Keuls, statistická významnost pro hodnotu parametru $p \leq 0,05$: nad sloupci v grafu se skupinou odpovídajícího značení, černě pro všechny tři časové intervaly, pro konkrétní časový interval v barvě časového intervalu.

7 Diskuze

Materiály, které mají sloužit jako kožní kryty nebo náhrady musí splňovat řadu kritérií. Zejména nesmí být toxické, měly by urychlovat proces hojení, zabraňovat infekci, měly by být snadno fyzicky a cenově dostupné a měly by pacientovi poskytovat co největší komfort. V případě povrchových poranění stačí použít kožní kryt, který pouze dočasně nahradí funkci kůže jako mechanické bariéry a pomáhá urychlit hojení. Kožní náhrady mají za cíl simulovat kožní tkáň ve struktuře i funkci při poraněních sahajících až do dermální části kůže a hlouběji. Měly by proto být biodegradabilní, bioresorbovatelné a podporovat adhezi a růst buněk (shrnutí v (Broussard and Powers, 2013)).

Celulóza je dobře dostupný, levný a biokompatibilní biopolymer, proto je její využití v kožním tkáňovém inženýrství nasnadě. Celulóza se pro léčbu kožních poranění používá již tisíce let. Prvním doloženým případem bylo použití celulózy ve formě lněných plátů v 16. století před naším letopočtem. Další významný zlom přišel v 60. letech 19. století, kdy byla použita sterilizovaná gáza s antiseptickými vlastnostmi. Gáza sice částečně udržuje vlhkost v ráně, která je nezbytná pro dobré hojení a výsledný vzhled, ale v průběhu času vysychá a při následném odstraňování dochází ke strhávání tkáně (shrnutí v (Broussard and Powers, 2013)). V dnešní době je používáno vlhké krytí, které v ráně zajišťuje vlhkost po celou dobu léčby a důsledkem toho je zkrácena její doba (Souliotis et al., 2016). Jedním z typů vlhkého krytí jsou hydrokoloidy. Sodná sůl karboxymethylcelulózy se ve formě hydrokoloidu používá již řadu let (Guillén-Solà et al., 2013; Porter, 1991). Novější formou vlhkého krytí jsou hydrovlákna. Materiály ze sodné soli karboxymethylcelulózy (Hcel® NaT) ve formě hydrovláken, které byly používány v tomto projektu, byly primárně vyvíjeny pro účely kožního krytí. Nesmí tedy na buňky působit cytotoxicky, musí být mechanicky odolné pro snadnou manipulaci a při dočasném použití lehce odstranitelné, beze zbytku. Pozůstatky materiálu by mohly vyvolávat nežádoucí imunitní reakci. Sodná sůl karboxymethylcelulózy je vhodná pro léčbu poranění, neboť má přirozené hemostatické účinky (Chalupova et al., 2012), částečně antiadhezivní vlastnosti (Du et al., 2015), díky kterým je snadno snímatelná z rány a nevyvolává prozánětlivé reakce (Kollar et al., 2011). V *in vitro* testovacích podmínkách nebyl pozorován cytotoxický efekt materiálu na primární lidské kožní fibroblasty a na lidské keratinocyty linie HaCaT. Sodná sůl karboxymethylcelulózy je pH neutrální (Sopuch et al., 2013) a inkubací v médiu nedocházelo ke snižování pH. I mechanické vlastnosti materiálu vykazovaly vhodnost pro použití v klinické praxi.

V současné době je výběr ze širokého spektra kožních krytů s odlišnými vlastnostmi pro rány různých parametrů a fází hojení (shrnutí v (Dabiri et al., 2016)). Nabídka kožních náhrad

pro léčbu rozsáhlejších poranění však zatím není dostatečná a žádná z nich nedosahuje optimálních estetických výsledků bez tvorby jizev. Čím rychlejší je hojení, tím lepších estetických výsledků je dosahováno (Cubison et al., 2006). Kožní náhrady, například Biobrane®, zkracují délku hojení oproti běžným krytím, ale vytváří pravidelné jizvy v oblastech pórů náhrady (Ahmadi and Williams, 2009). V současné době je nejčastěji využívána autologní transplantace, ale i u ní dochází ke stahu rány a tvorby jizvy. Lepších kosmetických výsledků dosahuje komerčně dostupná dermální náhrada Integra®. Ta však neobsahuje žádné buňky, a tudíž trvá nějaký čas, než buňky pacienta ránu osídlí. Druhou nevýhodou je pouze dočasná přítomnost silikonové vrstvy zastupující funkci epidermis a nutná transplantace částečného dermoepidermálního štěpu (Nguyen et al., 2010). Ideální kožní náhrada by měla obsahovat materiál, který by sloužil jako nosič buněk. Uvnitř jeho 3D struktury by byly kultivovány autologní fibroblasty, které by produkovaly proteiny mezibuněčné hmoty a růstové faktory pro keratinocyty. Na materiálu by byly kultivovány autologní keratinocyty a tato náhrada obsahující dvouvrstvu buněk by byla implantována pacientovi (Mahjour et al., 2015). Nároky na takové materiály jsou větší než nároky na kožní kryty, neboť musí podporovat adhezi a růst buněk v čase, pokud možno kratším, než je tomu *in vivo*.

Z toho důvodu byly materiály Hcel® NaT testovány jako potenciální kožní náhrady. Byly zkoumány vlastnosti pro adhezi a následnou proliferaci kožních buněk. Materiály měly dvě formy struktury. Struktura materiálů 3 a 6 byla ve formě neuspořádaných vláken homogenně rozprostřených v celé ploše. Materiály 1, 2, 4, 5 a 7 měly vlákna uspořádaná do kříže kolem pórů. Adheze a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů se mezi jednotlivými typy materiálů lišila, ale nebyla shledána souvislost s formou struktury vláken. Na žádném z materiálů Hcel® NaT však adheze a proliferace nebyla uspokojivá. Ani materiál s nejvyšší proliferací buněk nedosahoval takových hodnot jako kontrolní materiál a ideálně by proliferace buněk na materiálech měla být srovnatelná, nebo i vyšší. Neboť je karboxymetylcelulóza běžně používaná v prevenci pooperačních srůstů, lze usuzovat, že její vlastnosti nepodporují adhezi buněk (Ryan and Sax, 1995; Wurster et al., 1995). Průměr vláken v řádu desítek mikrometrů je relativně velký a jak již bylo zmíněno v literárním úvodu, mikrostrukturované povrchy příliš nepodporují adhezi buněk, na rozdíl od nanostrukturovaných materiálů (shrnuto v (Bacakova et al., 2011)). Velikost pórů mezi vlákny v řádu tisíců mikrometrů čtverečných byly pro buňky relativně velké a buňky mohly snadno propadnout skrz póry až na polystyrenové dno kultivační jamky. Z tohoto důvodu byl na materiály Hcel® NaT nasazován vyšší počet primárních lidských kožních fibroblastů, aby se zvýšilo procento buněk zachycených na vláknech, které by mohly kolonizovat materiál.

Fibroblasty, které se zachytily na vláknech, ale s obtížemi migrovaly, aby navázaly kontakt se sousedními buňkami. Docházelo k tvorbě izolovaných populací, které materiál ztěžka zaplňovaly. Pro klinické použití je ovšem snaha počet potřebných buněk, co nejvíc snížit, aby odběr buněk byl co nejmenší zásah do organismu. Rozdíly v adhezi primárních lidských kožních fibroblastů na jednotlivé typy Hcel® NaT mohly být způsobené rozdílnou cytotoxicitou materiálů nebo rozdílnými parametry materiálů. Cytotoxicita, měřená proliferací buněk ve výluzech materiálů v systému xCELLigence®, se neprokázala u žádného z materiálů. S podivem výluhy z některých materiálů (např. typ 3), které nepodporovaly adhezi buněk, dosahovaly vyšších hodnot proliferace naměřených systémem xCELLigence® než materiály s lepší adhezí buněk (např. typ 1). To mohlo být způsobené vyšší přítomností celulózových vláken odpadlých z okrajů materiálu, které byly uvolněny následkem manipulace u materiálů s nižšími hodnotami buněčného indexu. Vláknina přítomná ve výluhu adherovala na dno a znesnadnila adhezi buňkám. Dalším možným vysvětlením je vyšší přítomnost cytostatických či cytotoxických látek ve výluhu, které byly ve velice nízkých hodnotách, takže buňky dokázaly proliferovat, ale s nižší rychlostí, než tomu bylo u materiálů s vyšším buněčným indexem. Každopádně rozdíly hodnot buněčného indexu mezi jednotlivými materiály nebyly příliš velké. Rozdílné fyzikálně-chemické parametry mohly být ovlivňovány pH, stupněm substituce karboxymetylové skupiny nebo množstvím přítomného sodíku a ostatních kovů, stanovených jako síranový popel. Z dosažených výsledků se zdá, že čím nižší hodnota síranového popela, tím lépe na materiál buňky adherovaly. Možné vysvětlení je, že sodná sůl karboxymetylové skupiny ve vodě disociovala na kladně nabitý ion sodíku a záporně nabitou karboxymetylovou skupinu. Povrch celulózových vláken tak dostával záporný náboj, který nepodporuje adhezi buněk. V tom případě by ale schopnost buněk adherovat na materiál měla korelovat i s jeho stupněm substituce hydroxylových skupin za karboxymetylové skupiny (Tab. 3), a tak tomu zcela nebylo. Zároveň hodnota síranového popela neodpovídá pouze počtu karboxylových skupin, které jsou ve formě sodné soli, ale i přítomnosti jiných kovů. Vlastnosti materiálů jsou dány součtem různých faktorů a dalším činitelem ovlivňujícím adhezi buněk mohl být stupeň substituce (DS = degree of substitution). Bylo zjištěno, že DS ovlivňuje rychlost rozpouštění materiálu ve fyziologickém roztoku (Ohta et al., 2015). To znamená, že čím vyšší DS, tím rychleji se materiál rozpouští a tím dříve buňky ztrácí pevný podklad pro adhezi. Jak již bylo řečeno v literárním úvodu, tuhost materiálu je jeden z parametrů důležitých pro dobrou adhezi buněk. V případě našich materiálů mohlo docházet k částečnému narušení povrchu vláken, které nepříznivě ovlivňovalo adsorpci proteinů mezibuněčné hmoty a následnou adhezi buněk.

Nanotechnologie umožňují přípravu materiálů, jejichž vlákenná struktura je svými rozměry pro adhezi buněk ideální. Vláknina tvoří síť, do které se buňky zachytí, mohou migrovat a navazovat mezibuněčné kontakty a rovnoměrně pokrýt materiál. V této práci byly použity membrány z PCL, PLA/PCL a AC. Biodegradabilní a biokompatibilní vlastnosti těchto materiálů jsou vhodné pro použití v kožním tkáňovém inženýrství. Tyto vlastnosti lze navíc přizpůsobovat změnou fyzikálních a chemických parametrů. Na těchto nanovláknenných membránách byla rovněž sledována adheze a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů. Konfluentního pokrytí primárními lidskými kožními fibroblasty bylo dosaženo pouze u AC po 7 dnech kultivace. Na membránách z PCL a PLA/PCL fibroblasty nebyly schopné proliferovat a morfologie neodpovídala vitálním adherujícím buňkám. Keratinocyty linie HaCaT na membránách z PCL a PLA/PCL adherovaly a proliferovaly a svými hodnotami se blížily kontrolnímu materiálu. Tento značný rozdíl ve schopnosti adheze a proliferace byl dán tím, že primární kultury vyžadují optimální podmínky pro adhezi a růst, zatímco linie jsou obecně životaschopnější a méně citlivé na nepříznivé podmínky. Dobrá adheze a proliferace keratinocytů HaCaT značí, že méně citlivé buňky jsou schopné adherovat a míra negativního vlivu působícího na buněčnou adhezi tedy není velká. Stejně jako v případě materiálů Hcel® NaT bylo potřeba vyloučit cytotoxicitu materiálů, která mohla být způsobena rozpouštědly použitými při výrobě. Ani v případě nanovláknenných membrán nebylo potvrzeno uvolňování cytotoxických látek do kultivačního média. Co bylo nečekané, že adheze a růst primárních lidských kožních fibroblastů na materiálech, které byly týden louhované v kultivačním médiu, byla horší než na materiálech nelouhovaných. Pokud by materiály byly cytotoxické, došlo by louhováním ke snížení cytotoxicity a adheze a proliferace buněk by se naopak zlepšily. Pravděpodobně došlo ke změně fyzikálních nebo chemických vlastností materiálů, které v případě PCL a PLA/PCL nebyly ideální ani u nelouhovaných vzorků, zatímco u AC došlo ke změnám, které výrazně zhoršily adhezi a růst buněk. Mohlo docházet k degradaci materiálu. Degradace by se dala ověřit sledováním změn fyzikálně-chemických vlastností materiálu inkubovaného za stejných podmínek, které byly použity pro kultivaci buněk. Mezi sledované vlastnosti by patřil zejména kontaktní úhel, drsnost povrchu a chemické složení. Pomocí elektronové mikroskopie by mohla být sledována změna morfologie vláken, která by mohla naznačovat jejich degradaci. Je známo, že PCL a PLA vykazují relativně hydrofobní charakter, který byl patrně zachován i u jejich kopolymeru. Hydrofobicita PCL a PLA/PCL byla patrně příčinou špatné adheze primárních lidských kožních fibroblastů, které následkem toho podstupovaly anoikis. Hydrofobicitu těchto materiálů lze snížit hydrolýzou zásaditými roztoky (de Luca et al., 2014).

Nízkou adhezi buněk na materiál způsobenou nevhodnými parametry materiálu lze modifikací materiálů zvýšit, jak již bylo řečeno v literárním úvodu. Například ozařováním plazmatem (Reis et al., 2016), UV-zářením (Rebollar et al., 2014), působením proudu iontů (Bacakova et al., 1996), působením chemickými činidly (Takematsu et al., 2016), navázáním funkčních skupin (Zheng et al., 2015), polypeptidů (Hu et al., 1999) nebo biologicky aktivních látek (Wang et al., 2014). Další možností je také modifikace povrchu materiálu proteinovou vrstvou. Používají se proteiny přirozeně se vyskytující v těle, které nesou sekvence pro vazbu buněčných receptorů. Například proteiny mezibuněčné hmoty (kolagen, fibronektin, hyaluronan) nebo účastníci se procesu hojení (fibrin). Tyto proteiny jsou snadno izolovatelné přímo z pacienta a tím lze zabránit imunitní odpovědi. V předchozích studiích již byl prokázán příznivý vliv hyaluronanu na zvýšení adheze kožních fibroblastů (Mao et al., 2003). Také byl pomocí něj, na matrix představující dermis, připraven tenký film napodobující epidermis, který podporoval růst keratinocytů a zabraňoval jejich migraci do dermální části náhrady (Monteiro et al., 2015). Fibronektin patří mezi významné adhezivní proteiny. Buňky se na něj váží k aminokyselinové sekvenci „RGD“ prostřednictvím svých adhezivních receptorů (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). Fibronektinová vrstva může dále podporovat adsorpci samotného fibronektinu nebo dalších adhezivních molekul jako je vitronektin (Altankov et al., 2005). Protože u žádného z materiálů nebyla prokázána cytotoxicita, byla snaha upravit fyzikálně-chemické parametry materiálů. Materiály Hcel® NaT byly modifikovány kolagenovými a fibrinovými vrstvami, které měly za úkol vyplnit póry mezi vlákna a upravit povrch vláken jako takových. Použití kolagenu má více důvodů. V chronických ránách je kolagen, včetně nově nasyntetizovaného, nadměrně odbouráván enzymy zvanými matrix metaloproteinázy. Zároveň je snížena jeho exprese fibroblasty. Chybí tedy nosič buněk, po kterém by fibroblasty a jiné buněčné typy migrovaly do rány. Kolagen při procesu hojení atrahuje fibroblasty a makrofágy do poraněného místa, inaktivuje matrixové metaloproteinázy a mimo jiné umožňuje výměnu látek skrz póry, absorbuje exsudát a udržuje vlhké prostředí (Fleck and Simman, 2010). Kolagen se používá buď jako samotný nosič (Fleck and Simman, 2010), nebo je jednou ze složek náhrady, jako je tomu například u MatriDermu® (Min et al., 2014), Biobrane® (Tan et al., 2015), Integry® (Hodgkinson and Bayat, 2016) nebo Apligrafu® (Griffiths et al., 2004), nebo může být nanesen pro úpravu povrchu materiálu. Kolagen typu I byl s úspěchem použit pro zlepšení adheze a růstu kožních fibroblastů na nanovláknenných membránách z PCL/želatiny a z kopolymeru laktidu a kyseliny glykolové (= PLGA) (Gautam et al., 2014; Sadeghi et al., 2016). V tomto projektu byl také použit kolagen I pro úpravu vlastností materiálů Hcel® NaT. Byly připraveny dva typy kolagenových vrstev. Obě varianty protokolů potvrdily příznivý vliv kolagenu na adhezi kožních fibroblastů. Nicméně protokol č. 1 obalující vlákna a místy tvořící gelovitou strukturu podporoval adhezi

primárních lidských kožních fibroblastů více než protokol č. 2, který vytvářel jemnou síťku mezi vlákny. Možné vysvětlení je, že kolagenová síť je příliš jemná a buňky ji při nasednutí deformovaly vlastní vahou. S rostoucím časovým intervalem buněk přibývalo a síť mohla při určité zátěži povolit. Druhým vysvětlením je, že fibroblasty na povrch, na který adherují, působí trakčními silami. Tyto síly jsou menší u migrujících buněk než u adherujících, a tudíž po adhezi buněk na kolagen mohlo dojít k jeho deformaci (Harris et al., 1981). Deformace či poškození kolagenové vrstvy mohly mít vliv na budoucí osud buněk, které v tom místě adherovaly. Deformací kolagenové struktury mohlo dojít k mechanickému poškození buněk nebo k jejich odplavení. Kolagenové vrstvy bohužel byly velmi náchylné na deformaci při manipulaci se vzorky, proto jejich použití podle provedených protokolů není optimální pro klinickou praxi. Pevnost a biodegradabilita kolagenu může být zvýšena zesíťováním pomocí UV-záření po dobu 15 min (Weadock et al., 1996). Tohoto postupu ale bylo v této práci využito.

Dalším proteinem používaným pro podporu adheze kožních buněk je fibrin. Fibrin je schopen vázat integrinové receptory na buněčné membráně, zejména $\alpha_5\beta_1$ integriny. Navíc podporuje adsorpci adhezivních molekul, např. fibronektinu a vitronektinu, z kultivačního média nebo tělních tekutin, čímž dále podporuje buněčnou adhezi (Laurens et al., 2006). Fibrin kromě podpory adheze buněk zvyšuje produkci kolagenu I fibroblasty, který je hlavní složkou mezibuněčné hmoty (Bacakova et al., 2016a) a podporuje jejich migraci (Brown et al., 1993). Stejně jako v případě kolagenu je možné připravit celý nosič z fibrinu (Kober et al., 2015), ale fibrin samotný není schopný odolávat trakčním silám, kterými na něj buňky působí. Proto je vhodnější jej použít v kombinaci s jinými polymery, například kolagenem a glykosaminoglykany (Brougham et al., 2015), nebo pouze pro povrchovou úpravu materiálů (Bacakova et al., 2016a; Salem et al., 2013). V této práci byly připraveny dvě odlišné struktury fibrinových vrstev na materiálech Hcel® NaT podle dvou lišících se protokolů. První protokol měl za cíl upravit vlastnosti povrchu vláken karboxymethylcelulózy a tím podpořit adhezi primárních lidských kožních fibroblastů. Druhý protokol měl za cíl upravit strukturu materiálu vyplněním pórů mezi vlákny fibrinovou sítí a zabránit tak propadávání buněk až na dno kultivační jamky. Bylo očekáváno, že výrazně lepších výsledků dosáhne modifikace podle protokolu č. 2, protože se na materiálech zachytí větší počet buněk. Kromě toho struktura fibrinu vytváří nanostruktury, které jsou pro adhezi buněk příhodnější než mikrostrukturovaná vlákna celulózy. Fibrinové vrstvy podle obou protokolů dosahovaly srovnatelných hodnot buněčné proliferace, resp. metabolické aktivity buněk. Z toho vyplývá, že příčinou špatné adheze není tolik struktura a velikost vláken, ale zejména jejich fyzikální a chemické parametry. I když z mikroskopických snímků je patrné, že buňky i na fibrinové

vrstvě podle protokolu č. 1 adherují přednostně v místech, kde byla vytvořená síť. Je otázkou, jaká by byla adheze a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů, pokud by se podařilo vytvořit fibrinovou vrstvu pouze obalující vlákna a zda by byl rozdíl v proliferaci mezi fibrinovou vrstvou tvořící jemnou síť, jak bylo provedeno podle protokolu č. 2, a mezi vrstvou pouze obalující vlákna. Na nanovláknenných membránách nebylo třeba vytvářet nanostruktury a zaplňovat póry mezi vlákny, neboť materiály samotné již představovaly nanovláknennou síť. Patrně však membrány z PCL a PLA/PCL díky příliš hydrofobním vlastnostem neumožňovaly adhezi fibroblastů. Proto byla snaha tyto vlastnosti upravit fibrinovou vrstvou podle protokolu č. 1. Membrána z AC podporovala adhezi buněk a nebylo třeba upravovat její parametry. Jak již bylo řečeno výše, fibrin neumožňuje pouze lepší adhezi buněk, ale podporuje produkci kolagenu fibroblasty a také zlepšuje jejich migraci. Proto i na AC byla provedena modifikace fibrinem. Na všech nanovláknenných membránách došlo k výraznému zlepšení adheze a proliferace primárních lidských kožních fibroblastů. To potvrzuje dosavadní publikované výsledky (Bacakova et al., 2016a) a ukazuje to možnost, jak zkrátit potřebnou dobu kultivace buněk na materiálech pro kožní náhrady podpořením adheze a proliferace buněk. V našich studiích bylo zjištěno, že zatímco fibrin podporuje hlavně proliferaci fibroblastů, kolagen podporuje spíše proliferaci keratinocytů (Bacakova et al., 2016b). Kožní náhrada nesoucí dvojvrstvu buněk by tedy měla v dermální části obsahovat kožní fibroblasty kultivované na fibrinové vrstvě a epidermální část by měla obsahovat kolagenovou vrstvu nesoucí keratinocyty.

Ze všech použitých materiálů se pro účely kožních náhrad zdá nejperspektivnější acetát celulózy, ale bylo by potřeba propracovat technologii jeho zvláknování, neboť struktura materiálu byla velmi nehomogenní a membrána se podobala papíru, který byl v některých místech příliš tuhý, neforemný a naprosto postrádal elastické vlastnosti. Ostatní materiály by bylo možné použít jako nosič kožních buněk za předpokladu úpravy vlastností proteinovou modifikací. Vhodnější modifikací je fibrin díky jeho mechanicky odolnějším vlastnostem. Nanovláknenné materiály se obecně zdají být pro adhezi buněk vhodnější, a tedy i pro použití pro účely kožních náhrad. Materiály Hcel® NaT jsou perspektivní pro kožní krytí, ale pro účely kožních náhrad nejsou vhodné díky jejich struktuře.

Zajímavým adeptem pro kožní tkáňové inženýrství je bakteriální celulóza, která neobsahuje příměsy další polysacharidů a je přirozeně syntetizována ve formě nanovláken. Kultivací bakterií v bioreaktorech lze dosáhnout stálé a velké výrobní kapacity, kterou je navíc možné zvýšit jejich genetickou modifikací (Lee et al., 2014). Další výzkum ohledně úprav povrchových vlastností materiálu pro lepší adhezi buněk by mohl směřovat k přípravě bioaktivních povrchů vázajících adhezivní peptidy, jak již bylo demonstrováno u cévních

náhrad podporujících osídlení materiálu endotelovými buňkami (Gabriel et al., 2016). Další možností je vazba růstových faktorů, které podpoří proliferaci buněk a produkci mezibuněčné hmoty. Bylo by zajímavé zkusit zkombinovat modifikaci materiálů pomocí proteinových vrstev a zároveň pomocí růstových faktorů. Rychlejšího osídlení nosiče v celé ploše a tloušťce fibroblasty lze dosáhnout použitím krevních destiček, které produkují atraktanty a růstové faktory pro fibroblasty (Roubelakis et al., 2014).

Závěr

V rámci této diplomové práce byla hodnocena adheze a proliferace lidských kožních fibroblastů a lidských keratinocytů linie HaCaT na materiálech určených pro využití jako kožní kryty nebo kožní náhrady a byla hodnocena jejich cytotoxicita. Byly použity materiály ze sodné soli karboxymethylcelulózy (Hcel® NaT) pro účely kožního krytí, nebo spolu s nanovláknennými membránami z poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL), z kopolymeru L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu (PLA/PCL) a z acetátu celulózy (AC) pro účely kožních náhrad. Nanovláknenné membrány vykazovaly lepší adhezi buněk než celulózové materiály Hcel® NaT, patrně díky jejich vhodnější nanostrukturovanosti vláken a pórů mezi nimi. Nejvhodnějším materiálem pro růst kožních buněk byl AC. U PCL a PLA/PCL docházelo s rostoucím časovým intervalem ke snižování počtu buněk a ke změně jejich morfologie. U žádného z použitých materiálů nebyl prokázán cytotoxický vliv na kožní buňky. Nízký stupeň adheze a proliferace buněk jak na materiálech Hcel® NaT, tak na PCL a PLA/PCL byl proto přisouzen nevhodným fyzikálním a chemickým vlastnostem materiálů. Tyto vlastnosti byly upravovány proteinovými modifikacemi kolagenem typu I a fibrinem. U materiálů Hcel® NaT bylo hlavním cílem zaplnit póry mezi vlákny a vytvořit nanostrukturovanou podporu pro buňky. Byly použity dva odlišné protokoly pro tvorbu kolagenových s fibrinových vrstev, které se lišily výslednou strukturou vrstev. První protokol pro tvorbu kolagenových vrstev vytvářel gelovitou strukturu, druhý jemnou síť. Fibrinové vrstvy podle protokolu č. 1 především obalovaly vlákna celulózy a místy vytvářely jemnou síť, zatímco podle druhého protokolu vznikala jemná síťka ležící na vláknech, která zcela zaplnila póry mezi vlákny celulózy. U nanovláknenných membrán bylo cílem upravit fyzikálně-chemické parametry povrchu vláken. Proto byly připraveny fibrinové vrstvy podle prvního protokolu, které stejně jako na materiálech Hcel® NaT obalovaly vlákna a místy tvořily síť. Všechny výše zmíněné modifikace byly v čase stabilní, neměnily svoji strukturu a výrazně zvýšily schopnost buněk adherovat na materiál. Následkem zvýšené adheze byl pozorován vyšší počet buněk ve všech časových intervalech. Kolagenová vrstva připravená dle protokolu č. 1 dosahovala lepších výsledků než vrstva podle protokolu č. 2. Sedmý den po nasazení převyšoval počet buněk na této vrstvě hodnotu na kontrolním polystyrenovém materiálu. Obě fibrinové vrstvy dosáhly srovnatelných hodnot, které již 1. den po nasazení buněk byly vyšší než hodnoty na kontrolním materiálu. Nepatrně lepší výsledek byl dosažen protokolem č. 2. Obecně však fibrinové vrstvy více podporovaly adhezi a růst lidských kožních fibroblastů a byly mechanicky odolnější než vrstvy kolagenové. U nanovláknenných membrán fibrin zlepšil adhezi a růst buněk oproti nemodifikovaným membránám, ale pouze u AC bylo 7. den po nasazení buněk dosaženo vyšších hodnot než na kontrolním materiálu. Z této práce tedy

vyplývá, že nanovláknenné materiály jsou pro účely kožních náhrad vhodnější než celulózkové materiály Hcel® NaT. Jako nejlepší materiál pro přípravu nanovláknenných membrán se jeví acetát celulózy. Proteinovou modifikací lze zlepšit vlastnosti materiálů pro adhezi a růst buněk, především použitím fibrinu. Proteinové modifikace vytvářejí stejné struktury bez ohledu na typ materiálu a jeho strukturu vláken.

Literatura

Abedalwafa, M., Wang, F., Wang, L., and Li, C. (2013). Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL). *Reviews on Advanced Materials Science* 34, 123 - 140.

Ahmadi, H., and Williams, G. (2009). Permanent scarring in a partial thickness scald burn dressed with Biobrane. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62, 697-698.

Alrubaiy, L., and Al-Rubaiy, K.K. (2009). Skin substitutes: a brief review of types and clinical applications. *Oman medical journal* 24, 4-6.

Altankov, G., Albrecht, W., Richau, K., Groth, T., and Lendlein, A. (2005). On the tissue compatibility of poly(ether imide) membranes: an in vitro study on their interaction with human dermal fibroblasts and keratinocytes. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 16, 23-42.

Atila, D., Keskin, D., and Tezcaner, A. (2015). Cellulose acetate based 3-dimensional electrospun scaffolds for skin tissue engineering applications. *Carbohydr Polym* 133, 251-261.

Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T., and Svorcik, V. (2011). Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* 29, 739-767.

Bacakova, L., Mares, V., Bottone, M.G., Pellicciari, C., Lisa, V., and Svorcik, V. (2000). Fluorine ion-implanted polystyrene improves growth and viability of vascular smooth muscle cells in culture. *Journal of biomedical materials research* 49, 369-379.

Bacakova, L., Svorcik, V., Rybka, V., Micek, I., Hnatowicz, V., Lisa, V., and Kocourek, F. (1996). Adhesion and proliferation of cultured human aortic smooth muscle cells on polystyrene implanted with N⁺, F⁺ and Ar⁺ ions: correlation with polymer surface polarity and carbonization. *Biomaterials* 17, 1121-1126.

Bacakova, M., Musilkova, J., Riedel, T., Stranska, D., Brynda, E., Zaloudkova, M., and Bacakova, L. (2016a). The potential applications of fibrin-coated electrospun polylactide nanofibers in skin tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 11, 771-789.

Bacakova, M., Pajorova, J., Stranska, D., Riedel, T., Brynda, E., Zaloudkova, M., and Bacakova, L. (2016b). Protein nanocoatings on synthetic polymeric nanofibrous membranes as carriers for skin cells. Submitted to PLoS ONE; after revision.

Bačáková, L., Filová, E., Rypáček, F., Švorčík, V., and Starý, V. (2004). Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering. *Physiological Research* 53, 35 - 45.

Baghai, M., Tamura, N., Beyersdorf, F., Henze, M., Prucker, O., Ruhe, J., Goto, S., Zieger, B., and Heilmann, C. (2014). Platelet repellent properties of hydrogel coatings on polyurethane-coated glass surfaces. *ASAIO J* 60, 587-593.

Bahrami, H., Keshel, S.H., Chari, A.J., and Biazar, E. (2015). Human unrestricted somatic stem cells loaded in nanofibrous PCL scaffold and their healing effect on skin defects. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 1-5.

BaoLin, G., and Ma, P.X. (2014). Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Science China Chemistry* 57, 490-500.

Bet, M.R., Goissis, G., Vargas, S., and Selistre-de-Araujo, H.S. (2003). Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. *Biomaterials* 24, 131-137.

Braghirolli, D.I., Steffens, D., and Pranke, P. (2014). Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. *Drug Discov Today* 19, 743-753.

Brougham, C.M., Levingstone, T.J., Jockenhoevel, S., Flanagan, T.C., and O'Brien, F.J. (2015). Incorporation of fibrin into a collagen-glycosaminoglycan matrix results in a scaffold with improved mechanical properties and enhanced capacity to resist cell-mediated contraction. *Acta Biomater* 26, 205-214.

Broussard, K.C., and Powers, J.G. (2013). Wound Dressings: Selecting the Most Appropriate Type. *American journal of clinical dermatology* 14, 449-459.

Brown, L.F., Lanir, N., McDonagh, J., Tognazzi, K., Dvorak, A.M., and Dvorak, H.F. (1993). Fibroblast migration in fibrin gel matrices. *American Journal of Pathology* 142, 273-283.

Cowan, N.G., Banerji, J.S., Johnston, R.B., Duty, B.D., Bakken, B., Hedges, J.C., Kozlowski, P.M., Hefty, T.R., and Barry, J.M. (2015). Renal Autotransplantation: 27-Year Experience at 2 Institutions. *J Urol* 194, 1357-1361.

Cubison, T.C., Pape, S.A., and Parkhouse, N. (2006). Evidence for the link between healing time and the development of hypertrophic scars (HTS) in paediatric burns due to scald injury. *Burns* 32, 992-999.

Dabiri, G., Damstetter, E., and Phillips, T. (2016). Choosing a Wound Dressing Based on Common Wound Characteristics. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 5, 32-41.

de Luca, A.C., Terenghi, G., and Downes, S. (2014). Chemical surface modification of poly-epsilon-caprolactone improves Schwann cell proliferation for peripheral nerve repair. *J Tissue Eng Regen Med* 8, 153-163.

Delmonico, F.L., and McBride, M.A. (2008). Analysis of the wait list and deaths among candidates waiting for a kidney transplant. *Transplantation* 86, 1678-1683.

Du, X.H., Liu, J.Q., Xin, K., and Liu, G.H. (2015). Dexamethasone and sodium carboxymethyl cellulose prevent postoperative intraperitoneal adhesions in rats. *Braz J Med Biol Res* 48, 344-348.

Dubsky, M., Kubinova, S., Sirc, J., Voska, L., Zajicek, R., Zajicova, A., Lesny, P., Jirkovska, A., Michalek, J., Munzarova, M., *et al.* (2012). Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing. *J Mater Sci Mater Med* 23, 931-941.

Duncan, T.V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *J Colloid Interface Sci* 363, 1-24.

Duske, K., Koban, I., Kindel, E., Schroder, K., Nebe, B., Holtfreter, B., Jablonowski, L., Weltmann, K.D., and Kocher, T. (2012). Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. *J Clin Periodontol* 39, 400-407.

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-689.

Fahey, J.L., Mann, D.L., Asofsky, R., and Rogentine, N. (1969). Recent progress in human transplantation immunology. *Annals of internal medicine* 71, 1177-1196.

Fleck, C.A., and Simman, R. (2010). Modern collagen wound dressings: function and purpose. *J Am Col Certif Wound Spec* 2, 50-54.

Franceschini, G., Visconti, G., Sanchez, A.M., Di Leone, A., Salgarello, M., and Masetti, R. (2015). Oxidized regenerated cellulose in breast surgery: experimental model. *J Surg Res* 198, 237-244.

Frisch, S.M., and Ruoslahti, E. (1997). Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology* 9.

Gabriel, M., Niederer, K., Becker, M., Raynaud, C.M., Vahl, C.F., and Frey, H. (2016). Tailoring Novel PTFE Surface Properties: Promoting Cell Adhesion and Antifouling Properties via a Wet Chemical Approach. *Bioconjug Chem* 27, 1216-1221.

Gautam, S., Chou, C.F., Dinda, A.K., Potdar, P.D., and Mishra, N.C. (2014). Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 34, 402-409.

Goddard, M.J., Foweraker, J.E., and Wallwork, J. (2000). Xenotransplantation--2000. *Journal of clinical pathology* 53, 44-48.

Gotfredsen, K., Berglundh, T., and Lindhe, J. (2000). Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in rabbits. *Clinical implant dentistry and related research* 2, 120-128.

Griffiths, M., Ojeh, N., Livingstone, R., Price, R., and Navsaria, H. (2004). Survival of Apligraf in acute human wounds. *Tissue engineering* 10, 1180-1195.

Grimsby, G.M., and Baker, L.A. (2014). The use of autologous buccal mucosa grafts in vaginal reconstruction. *Curr Urol Rep* 15, 428.

Guillén-Solà, M., Mieras, A.S., and Tomàs-Vidal, A.M. (2013). A multi-center, randomized, clinical trial comparing adhesive polyurethane foam dressing and adhesive hydrocolloid dressing in patients with grade II pressure ulcers in primary care and nursing homes. *BioMed Central Family Practice* 14, 1-8.

Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321.

Halim, A.S., Khoo, T.L., and Mohd Yussof, S.J. (2010). Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. *Indian J Plast Surg* 43, S23-28.

Han, D., and Gouma, P.I. (2006). Electrospun bioscaffolds that mimic the topology of extracellular matrix. *Nanomedicine* 2, 37-41.

Harris, A.K., Stopak, D., and Wild, P. (1981). Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 290, 249-250.

Heitz, J., Svorcik, V., Bacakova, L., Rockova, K., Ratajova, E., Gumpenberger, T., Bauerle, D., Dvorankova, B., Kahr, H., Graz, I., *et al.* (2003). Cell adhesion on polytetrafluoroethylene modified by UV-irradiation in an ammonia atmosphere. *J Biomed Mater Res A* 67, 130-137.

Hodgkinson, T., and Bayat, A. (2016). In vitro and ex vivo analysis of hyaluronan supplementation of Integra(R) dermal template on human dermal fibroblasts and keratinocytes. *J Appl Biomater Funct Mater* 14, e9-e18.

Horton, M.A. (1997). The α 5 β 3 Integrin "Vitronectin Receptor". *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 29.

Hu, M., Sabelman, E.E., Lai, S., Timek, E.K., Zhang, F., Hentz, V.R., and Lineaweaver, W.C. (1999). Polypeptide resurfacing method improves fibroblast's adhesion to hyaluronan strands. *Journal of biomedical materials research* 47, 79-84.

Hua, K., Rocha, I., Zhang, P., Gustafsson, S., Ning, Y., Stromme, M., Mihranyan, A., and Ferraz, N. (2016). Transition from Bioinert to Bioactive Material by Tailoring the Biological Cell Response to Carboxylated Nanocellulose. *Biomacromolecules* 17, 1224-1233.

Huang, S., Chen, C.S., and Ingber, D.E. (1998). Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Molecular biology of the cell* 9, 3179-3193.

Hulla, J.E., Sahu, S.C., and Hayes, A.W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Hum Exp Toxicol* 34, 1318-1321.

Humphries, J.D., Askari, J.A., Zhang, X.P., Takada, Y., Humphries, M.J., and Mould, A.P. (2000). Molecular basis of ligand recognition by integrin α 5 β 1. II. Specificity of arg-gly-Asp binding is determined by Trp157 OF THE α subunit. *J Biol Chem* 275, 20337-20345.

Chalupova, M., Suchy, P., Prazanova, G., Bartosova, L., Sopuch, T., and Havelka, P. (2012). Local tissue reaction after the application of topical hemostatic agents in a rat partial nephrectomy model. *J Biomed Mater Res A* 100, 1582-1590.

Chang, W.J., Pan, Y.H., Tzeng, J.J., Wu, T.L., Fong, T.H., Feng, S.W., and Huang, H.M. (2015). Development and Testing of X-Ray Imaging-Enhanced Poly-L-Lactide Bone Screws. *PLoS One* 10, e0140354.

Idrus, R.B., Rameli, M.A., Low, K.C., Law, J.X., Chua, K.H., Latiff, M.B., and Saim, A.B. (2014). Full-thickness skin wound healing using autologous keratinocytes and dermal fibroblasts with fibrin: bilayered versus single-layered substitute. *Advances in skin & wound care* 27, 171-180.

Immich, A.P., Arias, M.L., Carreras, N., Boemo, R.L., and Tornero, J.A. (2013). Drug delivery systems using sandwich configurations of electrospun poly(lactic acid) nanofiber membranes and ibuprofen. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33, 4002-4008.

Jung, S.K., Gorski, W., Aspinwall, C.A., Kauri, L.M., and Kennedy, R.T. (1999). Oxygen microsensor and its application to single cells and mouse pancreatic islets. *Analytical Chemistry* 71.

Jung, Y., Kim, S.H., You, H.J., Kim, S.H., Kim, Y.H., and Min, B.G. (2008). Application of an elastic biodegradable poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold for cartilage tissue regeneration. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 19, 1073-1085.

Kato, K., Chin, K., Yoshikawa, T., Yamaguchi, K., Tsuji, Y., Esaki, T., Sakai, K., Kimura, M., Hamaguchi, T., Shimada, Y., *et al.* (2012). Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer. *Invest New Drugs* 30, 1621-1627.

Khatib, L., Golan, D.E., and Cho, M. (2004). Physiologic electrical stimulation provokes intracellular calcium increase mediated by phospholipase C activation in human osteoblasts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 1903-1905.

Kober, J., Gugerell, A., Schmid, M., Kamolz, L.P., and Keck, M. (2015). Generation of a Fibrin Based Three-Layered Skin Substitute. *Biomed Res Int* 2015, 170427.

Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A., and Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* 3, 203-213.

Kollar, P., Zavalova, V., Hosek, J., Havelka, P., Sopuch, T., Karpisek, M., Tretinova, D., and Suchy, P., Jr. (2011). Cytotoxicity and effects on inflammatory response of modified types of cellulose in macrophage-like THP-1 cells. *Int Immunopharmacol* 11, 997-1001.

Labet, M., and Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem Soc Rev* 38, 3484-3504.

Lakshmanan, R., Kumaraswamy, P., Krishnan, U.M., and Sethuraman, S. (2016). Engineering a growth factor embedded nanofiber matrix niche to promote vascularization for functional cardiac regeneration. *Biomaterials* 97, 176-195.

Lam, K.H., Nijenhuis, A.J., Bartels, H., Postema, A.R., Jonkman, M.F., Pennings, A.J., and Nieuwenhuis, P. (1995). Reinforced poly(L-lactic acid) fibres as suture material. *Journal of applied biomaterials : an official journal of the Society for Biomaterials* 6, 191-197.

Langer, R.V., J. P. (1993). Tissue engineering. *Science* 260.

Laurens, N., Koolwijk, P., and de Maat, M.P. (2006). Fibrin structure and wound healing. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 4, 932-939.

Lee, H.J., Hong, J.K., Goo, H.C., Lee, W.K., Park, K.D., Kim, S.H., Yoo, Y., and Kim, Y.H. (2002). Improved blood compatibility and decreased VSMC proliferation of surface-modified metal grafted with sulfonated PEG or heparin. *Journal of Biomaterials Science* 13.

Lee, K.Y., Buldum, G., Mantalaris, A., and Bismarck, A. (2014). More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromol Biosci* 14, 10-32.

Leonardis, M., Palange, A., Dornelles, R.F., and Hund, F. (2010). Use of cross-linked carboxymethyl cellulose for soft-tissue augmentation: preliminary clinical studies. *Clin Interv Aging* 5, 317-322.

Leto Barone, A.A., Mastroianni, M., Farkash, E.A., Mallard, C., Albritton, A., Torabi, R., Leonard, D.A., Kurtz, J.M., Sachs, D.H., and Cetrulo, C.L., Jr. (2015). Genetically modified porcine split-thickness skin grafts as an alternative to allograft for provision of temporary wound coverage: preliminary characterization. *Burns* 41, 565-574.

MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* 445, 874-880.

Mahjour, S.B., Fu, X., Yang, X., Fong, J., Sefat, F., and Wang, H. (2015). Rapid creation of skin substitutes from human skin cells and biomimetic nanofibers for acute full-thickness wound repair. *Burns* 41, 1764-1774.

Mao, J.S., liu, H.F., Yin, Y.J., and Yao, K.D. (2003). The properties of chitosan–gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials* 24, 1621-1629.

McCarty, L.P., 3rd, Buss, D.D., Datta, M.W., Freehill, M.Q., and Giveans, M.R. (2013). Complications observed following labral or rotator cuff repair with use of poly-L-lactic acid implants. *J Bone Joint Surg Am* 95, 507-511.

McLafferty, E., Hendry, C., and Alistair, F. (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)* 27, 35-42.

McNamara, J.T., Morgan, J.L., and Zimmer, J. (2015). A molecular description of cellulose biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 84, 895-921.

Min, J.H., Yun, I.S., Lew, D.H., Roh, T.S., and Lee, W.J. (2014). The use of matrigel and autologous skin graft in the treatment of full thickness skin defects. *Arch Plast Surg* 41, 330-336.

- Mohamed, A., and Xing, M.M. (2012). Nanomaterials and nanotechnology for skin tissue engineering. *International journal of burns and trauma* 2, 29-41.
- Monteiro, I.P., Shukla, A., Marques, A.P., Reis, R.L., and Hammond, P.T. (2015). Spray-assisted layer-by-layer assembly on hyaluronic acid scaffolds for skin tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 103, 330-340.
- Nguyen, D.Q., Potokar, T.S., and Price, P. (2010). An objective long-term evaluation of Integra (a dermal skin substitute) and split thickness skin grafts, in acute burns and reconstructive surgery. *Burns* 36, 23-28.
- Nishio, S., Kosuga, K., Igaki, K., Okada, M., Kyo, E., Tsuji, T., Takeuchi, E., Inuzuka, Y., Takeda, S., Hata, T., *et al.* (2012). Long-Term (>10 Years) clinical outcomes of first-in-human biodegradable poly-l-lactic acid coronary stents: Igaki-Tamai stents. *Circulation* 125, 2343-2353.
- O'Sullivan, A.C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4.
- Ohta, S., Nishiyama, T., Sakoda, M., Machioka, K., Fuke, M., Ichimura, S., Inagaki, F., Shimizu, A., Hasegawa, K., Kokudo, N., *et al.* (2015). Development of carboxymethyl cellulose nonwoven sheet as a novel hemostatic agent. *J Biosci Bioeng* 119, 718-723.
- Park, K.S., Lee, K.E., Ku do, H., Kim, S.J., Park, W.S., Kim, H.Y., Kwon, M.R., and Youn, Y.K. (2013). Antiadhesive effect and safety of oxidized regenerated cellulose after thyroidectomy: a prospective, randomized controlled study. *J Korean Surg Soc* 84, 321-329.
- Pathak, M., Coombes, A.G., Turner, M.S., Palmer, C., Wang, D., and Steadman, K.J. (2015). Investigation of Polycaprolactone Matrices for Intravaginal Delivery of Doxycycline. *J Pharm Sci* 104, 4217-4222.
- Periasamy, V.S., Athinarayanan, J., Al-Hadi, A.M., Juhaimi, F.A., Mahmoud, M.H., and Alshatwi, A.A. (2015). Identification of titanium dioxide nanoparticles in food products: induce intracellular oxidative stress mediated by TNF and CYP1A genes in human lung fibroblast cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 39, 176-186.
- Ponec, M. (2002). Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. *Advanced drug delivery reviews* 54 Suppl 1, S19-30.
- Porter, J.M. (1991). A comparative investigation of re-epithelialisation of split skin graft donor areas after application of hydrocolloid and alginate dressings. *British Journal of Plastic Surgery* 44, 333-337.

Pretula, J., Slomkowski, S., and Penczek, S. (2016). Polylactides-Methods of synthesis and characterization. *Advanced drug delivery reviews*.

Qiu, K., Chen, B., Nie, W., Zhou, X., Feng, W., Wang, W., Chen, L., Mo, X., Wei, Y., and He, C. (2016). Electrophoretic Deposition of Dexamethasone-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles onto Poly(L-Lactic Acid)/Poly(epsilon-Caprolactone) Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *ACS applied materials & interfaces* 8, 4137-4148.

Ranjbar-Mohammadi, M., and Bahrami, S.H. (2015). Development of nanofibrous scaffolds containing gum tragacanth/poly (epsilon-caprolactone) for application as skin scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 48, 71-79.

Rebollar, E., Perez, S., Hernandez, M., Domingo, C., Martin, M., Ezquerro, T.A., Garcia-Ruiz, J.P., and Castillejo, M. (2014). Physicochemical modifications accompanying UV laser induced surface structures on poly(ethylene terephthalate) and their effect on adhesion of mesenchymal cells. *Phys Chem Chem Phys* 16, 17551-17559.

Reis, R., Dumez, L.F., Tardy, B.L., Dagastine, R., Orbell, J.D., Schutz, J.A., and Duke, M.C. (2016). Towards Enhanced Performance Thin-film Composite Membranes via Surface Plasma Modification. *Sci Rep* 6, 29206.

Ren, X., and Ott, H.C. (2014). On the road to bioartificial organs. *Pflugers Arch* 466, 1847-1857.

Reza, A.T., and Nicoll, S.B. (2010). Characterization of novel photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels for encapsulation of nucleus pulposus cells. *Acta Biomater* 6, 179-186.

Reznickova, A., Novotna, Z., Kolska, Z., Kasalkova, N.S., Rimpelova, S., and Svorcik, V. (2015). Enhanced adherence of mouse fibroblast and vascular cells to plasma modified polyethylene. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 52, 259-266.

Rheinwald, J.G., and Green, H. (1975). Formation of a Keratinizing Epithelium in Culture by a Cloned Cell Line Derived from a Teratoma. *Cell* 6.

Rinn, J.L., Bondre, C., Gladstone, H.B., Brown, P.O., and Chang, H.Y. (2006). Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet* 2, e119.

Roubelakis, M.G., Trohatou, O., Roubelakis, A., Mili, E., Kalaitzopoulos, I., Papazoglou, G., Pappa, K.I., and Anagnou, N.P. (2014). Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem Cell Rev* 10, 417-428.

Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238, 491-497.

Ryan, C.K., and Sax, H.C. (1995). Evaluation of a carboxymethylcellulose sponge for prevention of postoperative adhesions. *American journal of surgery* 169, 154-159; discussion 159-160.

Sadeghi, A.R., Nokhasteh, S., Molavi, A.M., Khorsand-Ghayeni, M., Naderi-Meshkin, H., and Mahdizadeh, A. (2016). Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 66, 130-137.

Saino, E., Focarete, M.L., Gualandi, C., Emanuele, E., Cornaglia, A.I., Imbriani, M., and Visai, L. (2011). Effect of electrospun fiber diameter and alignment on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *Biomacromolecules* 12, 1900-1911.

Salem, S.A., Hwei, N.M., Bin Saim, A., Ho, C.C., Sagap, I., Singh, R., Yusof, M.R., Md Zainuddin, Z., and Idrus, R.B. (2013). Polylactic-co-glycolic acid mesh coated with fibrin or collagen and biological adhesive substance as a prefabricated, degradable, biocompatible, and functional scaffold for regeneration of the urinary bladder wall. *J Biomed Mater Res A* 101, 2237-2247.

Santander, S., Alcaine, C., Lyahyai, J., PÉRez, M.A., Rodellar, C., DoblarÉ, M., and Ochoa, I. (2014). In vitro osteoinduction of human mesenchymal stem cells in biomimetic surface modified titanium alloy implants. *Dental Materials Journal* 33, 305-312.

Shim, I.K., Jung, M.R., Kim, K.H., Seol, Y.J., Park, Y.J., Park, W.H., and Lee, S.J. (2010). Novel three-dimensional scaffolds of poly(L-lactic acid) microfibers using electrospinning and mechanical expansion: Fabrication and bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 95, 150-160.

Slepickova Kasalkova, N., Slepicka, P., Kolska, Z., and Svorcik, V. (2015). Wettability and Other Surface Properties of Modified Polymers.

Sopuch, T., Drahovzalova, R., Rydl, J., Bures, I., Milichovsky, M., Vytrasová, J., Motkova, P., Svorcik, V., Podlaha, J., Horakova, M., *et al.* (2013). Celulózové materiály v ošetřování ran. *Hojení ran* 7, 14 - 20.

Souliotis, K., Kalemikerakis, I., Saridi, M., Papageorgiou, M., and Kalokerinou, A. (2016). A cost and clinical effectiveness analysis among moist wound healing dressings versus traditional methods in home care patients with pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 24, 596-601.

Sprangers, B., Waer, M., and Billiau, A.D. (2008). Xenotransplantation: where are we in 2008? *Kidney Int* 74, 14-21.

- Staatz, W.D., Fok, K.F., Zutter, M.M., Adams, S.P., Rodriguez, B.A., and Santoro, S.A. (1991). Identification of a Tetrapeptide Recognition Sequence for the $\alpha 2\beta 1$ Integrin in Collagen. *The Journal of Biological Chemistry* 266.
- Sun, L., Stout, D.A., and Webster, T.J. (2012). The nano-effect: improving the long-term prognosis for musculoskeletal implants. *J Long Term Eff Med Implants* 22, 195-209.
- Supp, D.M., and Boyce, S.T. (2005). Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin Dermatol* 23, 403-412.
- Takematsu, E., Katsumata, K., Okada, K., Niinomi, M., and Matsushita, N. (2016). Bioactive surface modification of Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy through alkali solution treatments. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 62, 662-667.
- Tan, H., Wasiak, J., Paul, E., and Cleland, H. (2015). Effective use of Biobrane as a temporary wound dressing prior to definitive split-skin graft in the treatment of severe burn: A retrospective analysis. *Burns* 41, 969-976.
- Tracy, L.E., Minasian, R.A., and Caterson, E.J. (2016). Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 5, 119-136.
- Tzvetkova-Chevolleau, T., Stephanou, A., Fuard, D., Ohayon, J., Schiavone, P., and Tracqui, P. (2008). The motility of normal and cancer cells in response to the combined influence of the substrate rigidity and anisotropic microstructure. *Biomaterials* 29, 1541-1551.
- Ueki, K., Okabe, K., Miyazaki, M., Mukozawa, A., Moroi, A., Marukawa, K., Nakagawa, K., and Yamamoto, E. (2011). Skeletal stability after mandibular setback surgery: comparisons among unsintered hydroxyapatite/poly-L-lactic acid plate, poly-L-lactic acid plate, and titanium plate. *J Oral Maxillofac Surg* 69, 1464-1468.
- Velazquez-Avina, J., Monkemuller, K., Sakai, P., Sulbaran, M., Chavez-Vargas, C., Montalvo Jave, E., and Sobrino-Cossio, S. (2014). Hemostatic effect of oxidized regenerated cellulose in an experimental gastric mucosal resection model. *Endoscopy* 46, 878-882.
- Vermerris, W., and Abril, A. (2015). Enhancing cellulose utilization for fuels and chemicals by genetic modification of plant cell wall architecture. *Curr Opin Biotechnol* 32, 104-112.
- von Recum, H., Kikuchi, A., Yamato, M., Sakurai, Y., Okano, T., and Kim, S.W. (1999). Growth factor and matrix molecules preserve cell function on thermally responsive culture surfaces. *Tissue engineering* 5, 251-265.

- Wang, L.S., Lee, F., Lim, J., Du, C., Wan, A.C., Lee, S.S., and Kurisawa, M. (2014). Enzymatic conjugation of a bioactive peptide into an injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel system to promote the formation of functional vasculature. *Acta Biomater* 10, 2539-2550.
- Wang, Y.K., Wang, Y.H., Wang, C.Z., Sung, J.M., Chiu, W.T., Lin, S.H., Chang, Y.H., and Tang, M.J. (2003). Rigidity of collagen fibrils controls collagen gel-induced down-regulation of focal adhesion complex proteins mediated by $\alpha 2\beta 1$ integrin. *J Biol Chem* 278, 21886-21892.
- Weadock, K.S., Miller, E.J., Keuffel, E.L., and Dunn, M.G. (1996). Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *Journal of biomedical materials research* 32, 221-226.
- Webster, T.J., Ergun, C., Doremus, R.H., Siegel, R.W., and Bizios, R. (2000). Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of biomedical materials research* 51, 475-483.
- Weinzweig, J., Gottlieb, L.J., and Krizek, T.J. (1994). Toxic shock syndrome associated with use of Biobrane in a scald burn victim. *Burns* 20.
- Wen, J., Xu, Y., Li, H., Lu, A., and Sun, S. (2015). Recent applications of carbon nanomaterials in fluorescence biosensing and bioimaging. *Chem Commun (Camb)* 51, 11346-11358.
- Wurster, S.H., Bonet, V., Mayberry, A., Hoddinott, M., Williams, T., and Chaudry, I.H. (1995). Intraperitoneal sodium carboxymethylcellulose administration prevents reformation of peritoneal adhesions following surgical lysis. *J Surg Res* 59, 97-102.
- Yetisen, A.K., Qu, H., Manbachi, A., Butt, H., Dokmeci, M.R., Hinstroza, J.P., Skorobogatiy, M., Khademhosseini, A., and Yun, S.H. (2016). Nanotechnology in Textiles. *ACS Nano* 10, 3042-3068.
- Yunmin, M., Yuanyuan, L., Haiping, C., and Qingxi, H. (2015). Application and Analysis of Biological Electrospray in Tissue Engineering. *The open biomedical engineering journal* 9, 133-137.
- Zheng, Y., Xiong, C., Wang, Z., and Zhang, L. (2015). Enhanced osteoblast cells adhesion, spreading, and proliferation to surface-carboxylated poly(etheretherketone). *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 30, 302-318.
- Zigrino, P., Steiger, J., Fox, J.W., Loffek, S., Schild, A., Nischt, R., and Mauch, C. (2007). Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration. *J Biol Chem* 282, 30785-30793.

Přílohy

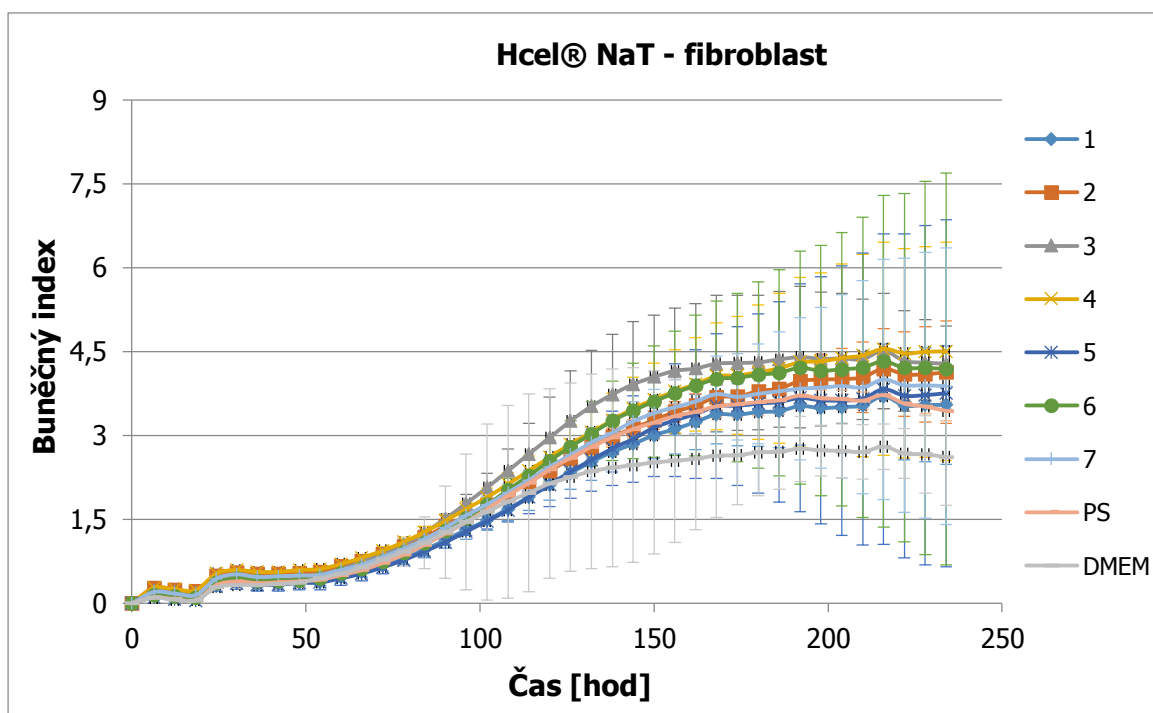
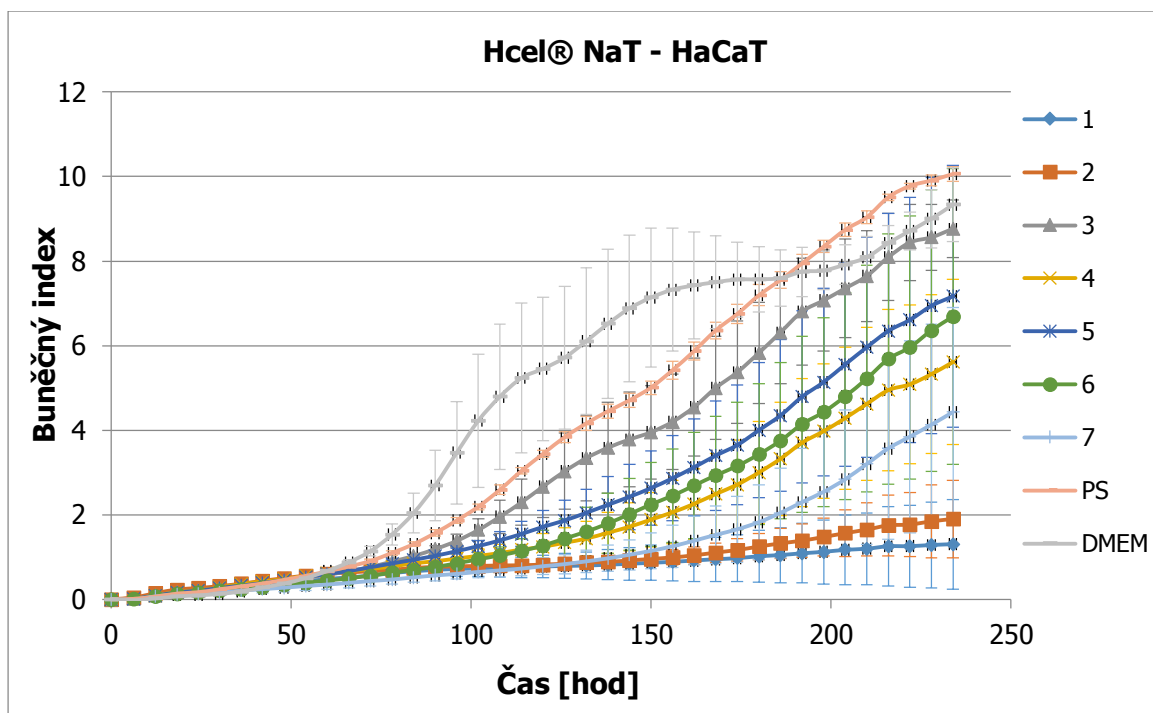
Typ kožního krytu	Zástupce	Klinické použití
Film	<ul style="list-style-type: none"> - Bioclusive® (Systagenix) - Blisterfilm™ (The Kendall Co) - Carrafilm™ (Carrington Laboratories) - Kendall™ Polyskin™ II (Covidien) - Mepore® Film (Molnlycke Health Care) - Omniderm® (Omidron Scientific Ltd) - Opsite™ (Smith & Nephew) - Tegaderm™ (3M) - Transeal® (DeRoyal) 	<ul style="list-style-type: none"> - Malá dárcovská místa dermoepidermálního kožního štěpu - Malé odřenin - Místa intravenózní aplikace - Krytí pro topickou léčbu - Sekundární krytí hydrogelů, pěn a alginátů - Popáleniny I. Stupně - Prevence proleženin - Proleženiny 1. stupně
Hydrogel	<ul style="list-style-type: none"> - 2nd skin® (Spenco Medical, Ltd) - Carrasyn® (Carrington Laboratories) - Clearsite® (ConMed Corporation) - Elasto-Gel™ (SW Technologies) - FlexiGel™ (Smith & Nephew) - Hypergel® (Molnlycke Health Care) - Kendall™ Curafil™ (Covidien) - Kendall™ Curagel™ (Covidien) - Normlgel® (Molnlycke Health Care) - Nu-gel® (Systagenix) - Tegagel™ (3 M) - Transigel™ (Smith & Nephew) - Vigilon® (C.R. Bard) 	<ul style="list-style-type: none"> - Suché žilní nebo tepenné vředy - Kalcifylaxe - Warfarinová nekróza - Bolestivé suché rány
Hydrokoloid	<ul style="list-style-type: none"> - Duoderm® (ConvaTec) - Comfeel® (Coloplast) - Cutinova® (Smith & Nephew) 	<ul style="list-style-type: none"> - Různé typy kožních vředů - Částečně hluboké popáleniny - Dárcovská místa

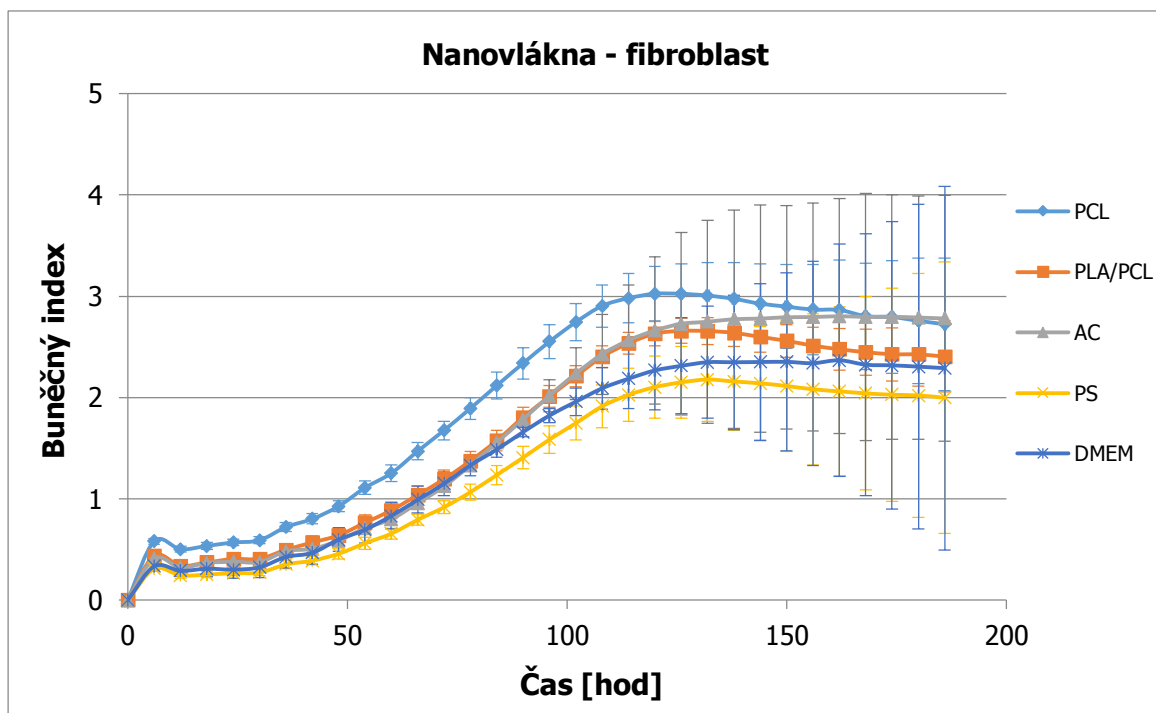
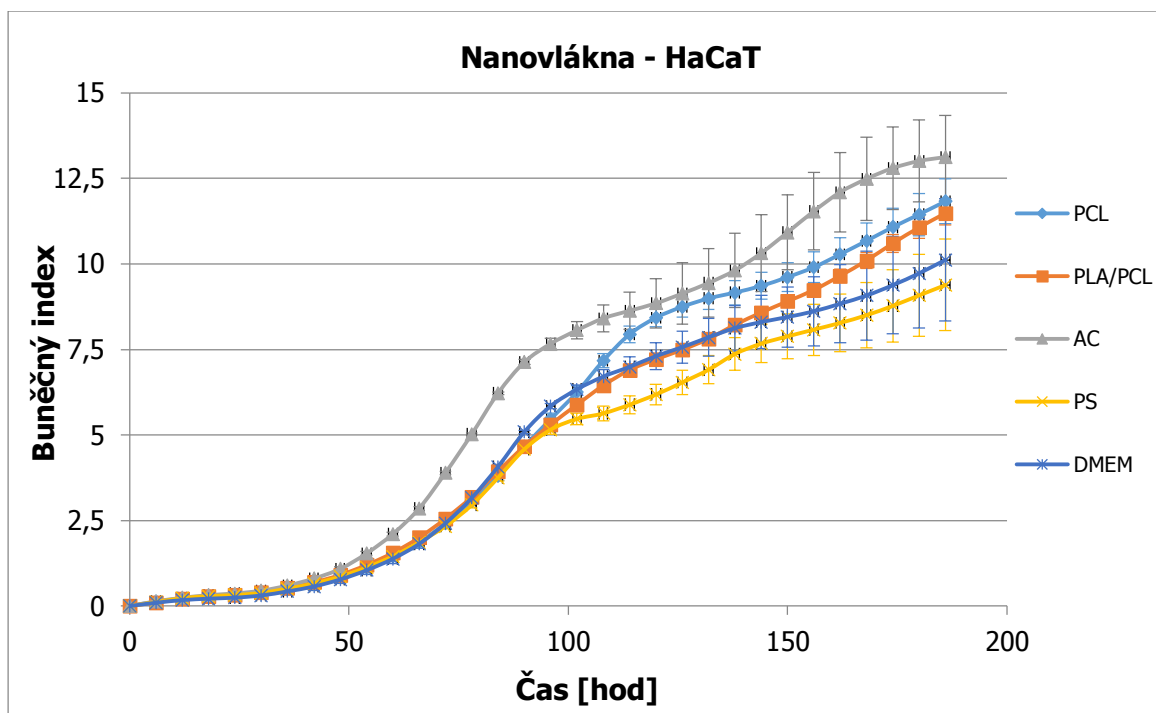
	<ul style="list-style-type: none"> - Hydrocol® II (UDL Laboratories) - NuDerm® (Systagenix) - Replicare® (Smith & Nephew) - Tegasorb™ (3 M) 	<ul style="list-style-type: none"> - Odřeniny - Povrchové akutní rány
Pěna	<ul style="list-style-type: none"> - Allevyn® (Smith & Nephew) - Aquacel® Foam (ConvaTec) - Biatain® (Coloplast) - Biopatch® (Johnson & Johnson Medical) - Flexzan® (UDL Laboratories) - Kendall™ Curafoam™ (Covidien) - Kendall™ Hydrasorb® (Covidien) - Lyofoam® (Molnlycke Health Care) - Mepilex® (Molnlycke Health Care) - Polymem® (Ferris Corp) 	<ul style="list-style-type: none"> - Rány přes kostní výčnělky - Rány mírně tvořící exsudát - Dárcovská místa
Alginát	<ul style="list-style-type: none"> - Algisite™ (Smith & Nephew) - Algosteril® (Systagenix) - Kendall™ Curasorb™ (Covidien) - Kalginate® (DeRoyal) - Kaltostat® (ConvaTec) - Melgisorb® (Molnlycke Health Care) - SeaSorb® (Coloplast) - Sorbsan® (UDL Laboratories) 	<ul style="list-style-type: none"> - Hluboké vředy tvořící exsudát - Pyoderma gangrenosum - Krvácející rány - Dárcovská místa
Hydrovlákna	<ul style="list-style-type: none"> - Aquacel® (ConvaTec) 	<ul style="list-style-type: none"> - Hluboké vředy tvořící exsudát - Pyoderma gangrenosum - Traumatické rány - Částečně hluboké popáleniny

Tab. 5 Shrnutí klinického použití a výčet komerčně dostupných zástupců jednotlivých typů kožních krytů pro vlhké hojení. Převzato a upraveno z (Broussard and Powers, 2013).

Typ kožní náhrady	Zástupce	Klinické použití
Epidermální	- Epicel® (Genzyme Biosurgery)	- Trvalé uzavření rány u popálenin na více než 30 % celkového povrchu těla a u vrozených pigmentových névů - Chronické bércové vředy
Dermální	- AlloDerm® (LifeCell Corporation) - Biobrane® (Bertek Pharmaceuticals) - Integra® (Integra Life Sciences) - Dermagraft® (Smith and Nephew) - TransCyte® (Smith and Nephew)	- Nosič pro transplantaci dermální části poraněné kůže - Reparace měkkých tkání - Dočasné přilnavé krytí rány popálenin a dárcovských míst - Léčba hlubokých popálenin v částečné nebo celé tloušťce kůže - Léčba hlubokých vředů diabetické nohy - Dočasné krytí hlubokých popálenin v částečné nebo celé tloušťce kůže před autotransplantací
Dermoepidermální	- Apligraf® (Organogenesis/Novartis) - OrCel® (Ortec International)	- Chronické bércové vředy, žilní vředy, popáleniny - Dárcovská místa při léčbě popálenin a pooperačních ran

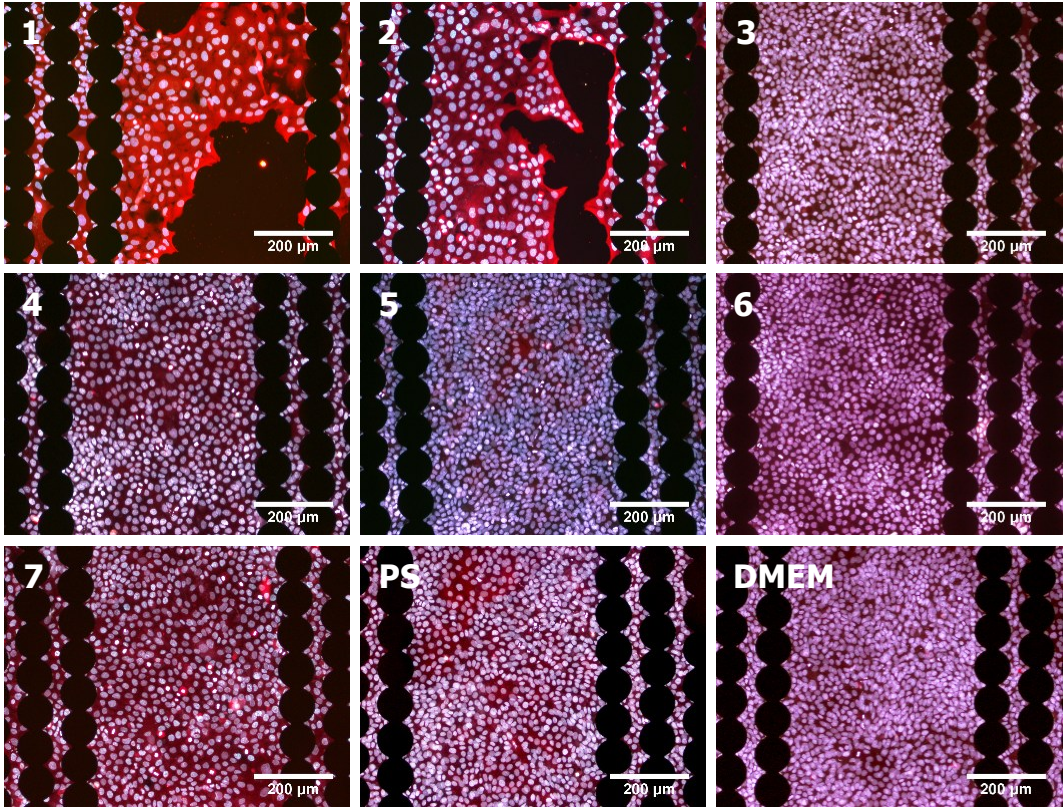
Tab. 6 Shrnutí klinického použití vybraných typů komerčně dostupných kožních náhrad. Převzato a upraveno z (Supp and Boyce, 2005).



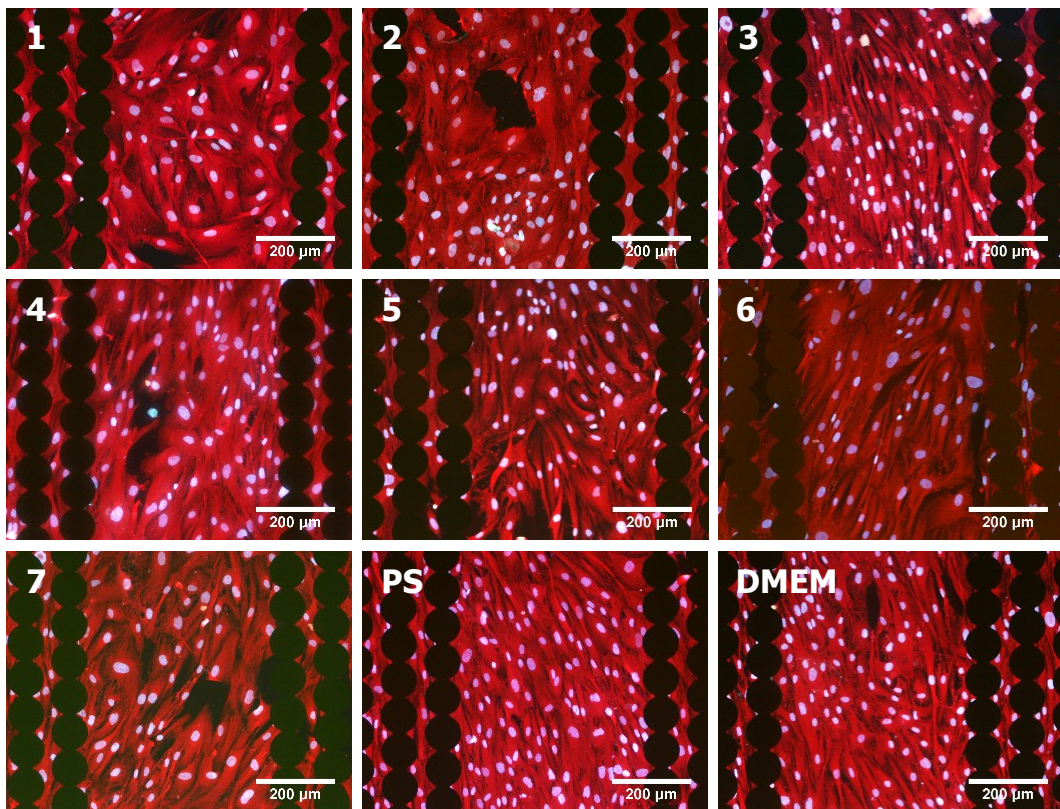


Graf 7 Proliferace keratinocytů linie HaCaT a primárních kožních fibroblastů v týdenních výluzích z materiálů Hcel® NaT (1 – 7) a z nanovláknenných membrán (PCL, PLA/PCL, AC). Jako kontrola bylo použito kultivační médium týden inkubované v polystyrenové kultivační jamce (PS) a čerstvé kultivační médium (DMEM). Růst buněk v čase byl sledován měřícím zařízením xCELLigence®, které zaznamenává změny impedance na zlatých mikroelektrodách na dnech kultivačních jamek a vynáší je jako hodnoty buněčného indexu.

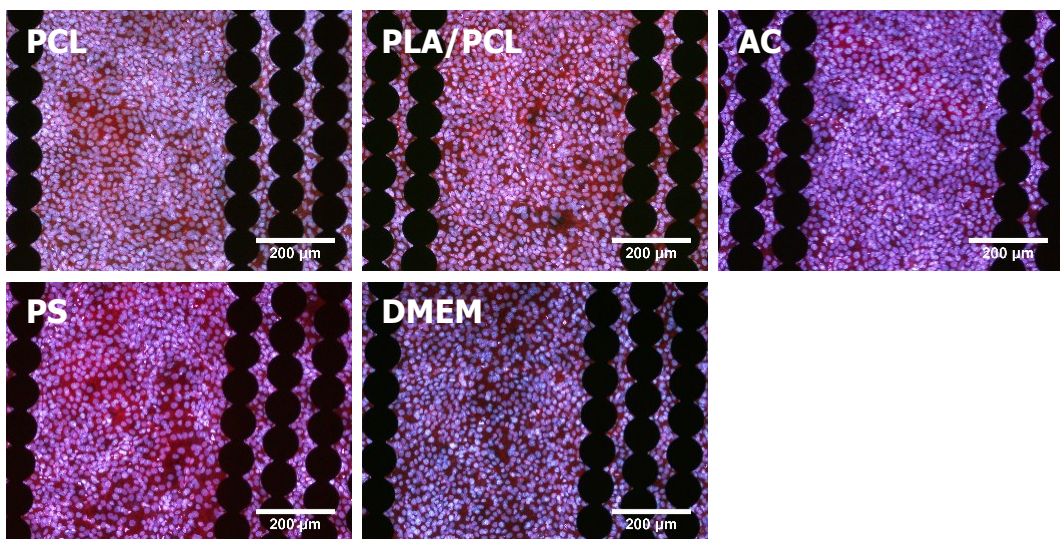
Hcel[®] NaT - HaCaT



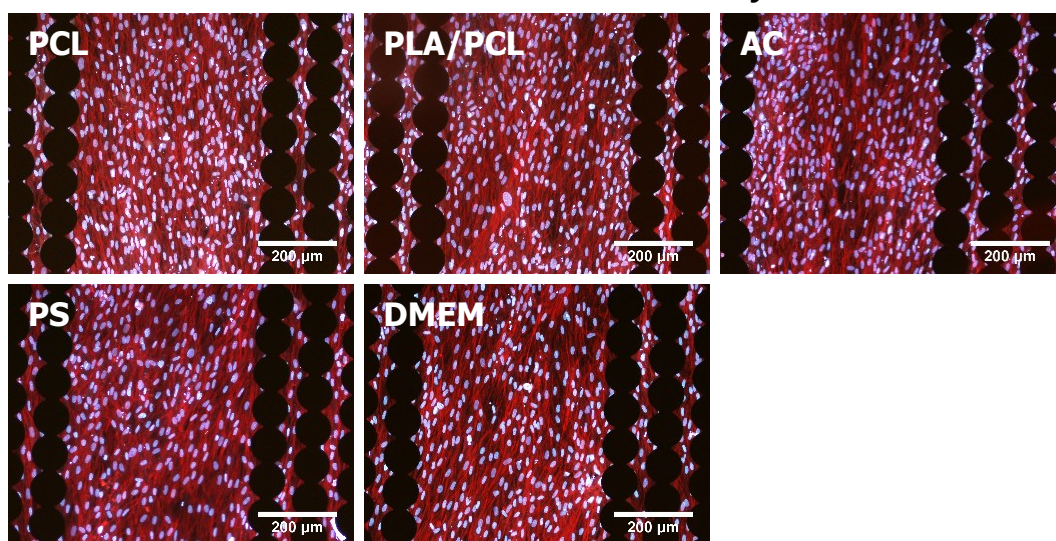
Hcel[®] NaT - fibroblasty



Nanovlákná - HaCaT



Nanovláknna - fibroblasty



Obr. 19 Morfologie keratinocytů linie HaCaT a primárních kožních fibroblastů po ukončení zaznamenávání růstu v přístroji xCELLigence®. Materiály Hcel® NaT barveny kombinací fluorescenčních barviv Texas Red C₂-maleimid (cytoplazma - červená) a Hoechst #3325 (jádra - modrá). Nanovláknenné membrány byly barveny kombinací Phalloidin-TRITC (aktin - červená) a Hoechst #3325 (jádra - modrá). Mikroskop Olympus IX 71 s digitální kamerou DP 70, obj. 10x, měřítko = 200 μm.